

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

E.A.P. DE ODONTOLOGÍA

Efecto antimicrobiano de la Óleo-resina de *Copaifera officinalis* sobre principales cepas bacterianas periodontópatogenas de la cavidad bucal

TESIS

Para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

AUTOR

Raúl Leonel García Arroyo

Lima – Perú

2013

Dedicatoria

A Dios que guía el rumbo por el cual encamino mi vida

*A mis padres, Leo y Angélica por
su apoyo incondicional en mi
crecimiento personal y
profesional*

*A todas las personas que participaron y me ayudaron
directa e indirectamente en la culminación de esta etapa*

Agradecimientos:

-A mi asesora Dra. María Angélica Álvarez Páucar, Profesora de Odontopediatría de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su invaluable guía académica y amistad que nos une por pertenecer al mismo Colegio Parroquial y a la misma alma Mater San Marcos.

-A la Dra. Hilda MoromiNakata, Profesora del Departamento de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su ayuda académica y consideración amical.

-Al Dr. CarhuapomaYance Profesor de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su apoyo en la obtención de los materiales para la realización del presente estudio.

-Al Dr. Abel Anglas y al Dr. Víctor Levano, por formar parte de mi jurado asesor y revisor del presente trabajo, por su apoyo y orientación académica.

-A todas las personas que de una u otra forma contribuyeron a la realización del presente estudio.

Resumen

“Efecto antimicrobiano de la óleo-resina de *Copaifera officinalis* sobre principales cepas periodontopatógenas de la cavidad bucal”

Autor: García AR. Asesora: Alvarez P MA.

La fitoterapia busca alternativas de solución a enfermedades bucales, con hierbas medicinales, como productos económicos y prácticos. La *Copaifera* es uno de los géneros de plantas medicinales más importantes en la región amazónica y Brasil y puede tener efecto antimicrobiano sobre las principales bacterias causantes de la enfermedad gingival y periodontal.

Objetivo: Determinar el efecto antimicrobiano de la óleo-resina de *Copaifera officinalis* sobre las principales cepas bacterianas periodontopatógenas (ATCC) *Porphyromona gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* a diversas concentraciones. Material y método: Se empleó la técnica de dilución en agar que permite hallar la concentración inhibitoria mínima. Se emplearon cepas ATCC de *Porphyromona gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* y la óleo-resina de *Copaifera officinalis* a 10 concentraciones: 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%, 1.56%, 0.78%, 0.39%, 0.19%. Se empleó la clorhexidina al 0.12% como control positivo, al agar schaedler puro y Tween 80 como controles negativos. Se emplearon 13 placas y se duplicó el ensayo. Resultados: La concentración inhibitoria mínima para *Porphyromona gingivalis* corresponde a 1.56%. Asimismo, la concentración inhibitoria mínima para el *Fusobacterium nucleatum* corresponde a 50% de óleo-resina. La clorhexidina mostró mayor efectividad al tener efecto a una menor concentración.

Conclusiones: La óleo-resina de *Copaifera officinalis* presentó efecto antimicrobiano frente a la cepa ATCC de *Porphyromona gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*, siendo el primero más sensible a su acción y el segundo más resistente.

Abstract

“Antimicrobial activity of the oleoresin of *Copaifera officinalis* against major periodontopathogenic bacteria of the oral cavity”

Autor: García AR. Asesora: Alvarez P MA.

Fitotherapy searches alternatives to solve oral diseases, with medicinal plants, as practical and low cost products. *Copaifera* is one the most important gender of medicinal plants in the Amazon region and Brazil. It might have an antimicrobial activity against major perioontopathogenic bacteria that gingivitis and periodontitis.

Objective: Determine the antimicrobial activity of the oleoresin of *Copaifera officinalis* against major periodontopathogenic bacteria (ATCC) *Porphyromona gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* at different concentrations.

Materials and methods: The agar dilution technique was used to determine the minimal inhibitory concentration. *Porphyromona gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* ATCC were used. The oleoresin at 10 concentrations::100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%, 1.56%, 0.78%, 0.39%, 0.19%. Clorhexidine 0.12% was used as positive control, pure Schaedler agar and Tween 80 as negative controls. 13 plates were used and the experiment was duplicated.

Results: the minimal inhibitory concentration for *Porphyromona gingivalis* was 1.56%. The minimal inhibitory concentration for *Fusobacterium nucleatum* was 50% of the concentration of the oleoresin. Clorhexidine was more effective at a lower concentration.

Conclusions: The oleoresin of *Copaifera officinalis* showed antimicrobial effect against *Porphyromona gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*, the first one was more sensitive and the second one was more resistant to the action of the oleoresin.

CONTENIDO	Páginas
I. INTRODUCCIÓN	5
II. MARCO TEORICO	
2.1.-Antecedentes	7
2.2.-Bases teóricas	11
2.3.-Planteamiento del problema	55
2.4.-Formulación del problema	55
2.5.-Justificación	57
2.6.-Limitaciones	57
2.7.-Objetivos de investigación	58
2.8.-Hipótesis	59
III. MATERIAL Y MÉTODOS	
3.1.-Tipo de estudio	60
3.2.-Población y muestra	60
3.3.-Operacionalización de variables	60
3.4.-Materiales	61
3.5.-Métodos	
3.5.1 Procedimientos y Técnicas	63
3.5.2 Procesamiento de Datos	71
IV. RESULTADOS	
4.1.-Determinación de CIM de <i>Copaífera officinalis</i> frente a <i>Porphyromona gingivalis</i>	71
4.2.-Determinación de CIM de <i>Copaífera officinalis</i> frente a <i>Fusobacterium nucleatum</i>	74
4.3.-Tablas y gráficos de resultados	79
V. DISCUSIONES	85
VI. CONCLUSIONES	88
VII. RECOMENDACIONES	89
VIII. BIBLIOGRAFIA	90
IX. ANEXOS	97

LISTA DE FIGURAS:

Fig. 1.- Placas de agar schaedler con óleo-resina de <i>Copaifera officinalis</i> al 0.78%	71
Fig. 2.- Medio agar schaedler de control de crecimiento <i>Porphyromona gingivalis</i>	72
Fig. 3.- Placas de agar schaedler con óleo-resina de <i>Copaifera officinalis</i> al 25%	73
Fig. 4.- Medio agar schaedler de control de crecimiento de <i>F.nucleatum</i>	74
Fig. 5.- Placas de agar schaedler con Clorhexidina al 0.12%	75
Fig. 6.- Placas de agar schaedler con agente emulsificante Tween 80 - Blanco estéril	76

LISTA DE TABLAS:

Tabla N° 1.- Cultivo de cepas bacterianas ATCC	64
Tabla N°2.- Determinación de efecto antimicrobiano de <i>Copaifera officinalis</i> y Concentración mínima inhibitoria sobre <i>Porphyromona gingivalis</i> y <i>Fusobacterium nucleatum</i>	78
Tabla N°3.- Crecimiento de <i>Porphyromona gingivalis</i> y <i>Fusobacterium nucleatum</i> frente a Clorhexidina al 0.12% como control positivo	79
Tabla N°4.- Crecimiento de <i>Porphyromona gingivalis</i> y <i>Fusobacterium nucleatum</i> frente a agente emulsificante Tween 80 como blanco estéril	79
Tabla N°5.- Ensayo duplicado de determinación de efecto antimicrobiano de <i>Copaifera officinalis</i> y Concentración mínima inhibitoria sobre <i>Porphyromona gingivalis</i> y <i>Fusobacterium nucleatum</i>	80
Tabla N°6.- Ensayo duplicado de Crecimiento de <i>Porphyromona gingivalis</i> y <i>Fusobacterium nucleatum</i> frente a Clorhexidina al 0.12% como control positivo	81
Tabla N°7.- Ensayo duplicado de Crecimiento de <i>Porphyromona gingivalis</i> y <i>Fusobacterium nucleatum</i> frente a agente emulsificante Tween 80 como blanco estéril	81

LISTA DE GRAFICOS

Gráfico N°1.- Concentración inhibitoria mínima de <i>Copaifera officinalis</i> sobre <i>Porphyromona gingivalis</i>	82
Gráfico N°2.- Concentración inhibitoria mínima de <i>Copaifera officinalis</i> sobre <i>Fusobacterium nucleatum</i>	82
Gráfico N°3.- Comparación entre el efecto de Clorhexidina en comparación a <i>Copaifera officinalis</i>	83

I. Introducción

La gran mayoría de los procesos infecciosos microbianos encontrados en la cavidad bucal, son debidos a los microorganismos habituales de la microbiota oral. La medicina no tradicional, específicamente la fitoterapia, trata de buscar alternativas de solución a enfermedades bucales, con hierbas medicinales, como productos económicos y prácticos.

En cuanto a la fitoterapia, el Perú, específicamente la zona amazónica, posee una vasta variedad de flora y una herencia genética de gran potencial para poder desarrollar nuevas alternativas medicinales. El cultivo, recolección y administración de plantas medicinales como opción de tratamiento y prácticas curativas están relacionadas principalmente con poblaciones de escasos recursos, sin embargo, actualmente, esta práctica se ha extendido a todas las clases sociales de varias regiones del mundo.¹

La *Copaifera*, es uno de los géneros de plantas medicinales más importantes en la región amazónica y en Brasil, ya que ésta exuda un aceite resinoso que posee múltiples propiedades farmacológicas demostradas. La *Copaifeira officinalis* fue la primera especie del género en ser descrita, como expresa el artículo de Lloyd 1898, y el artículo Constituintes das sementes de *Copaifera officinalis* de Veiga et al.,2007.²

La *Copaifera officinalis* puede tener efecto antimicrobiano sobre las principales bacterias causantes de la enfermedad gingival y periodontal en nuestra población, así como a nivel mundial. Se busca obtener alternativas de prevención, tratamiento y control de la enfermedad gingival y periodontal en el niño y adolescente. La prevalencia de Periodontitis en América del Norte es de 25-30%, en América del sur, Colombia 50.2%, Brasil 5.5-24%, Chile 50%, Argentina 10-49% y Perú 85%.³ La literatura nos asevera que las lesiones provocadas por las enfermedades periodontales en el tejido conectivo de

inserción del diente durante los primeros años de la adolescencia, son irreparables y que en la edad adulta, la enfermedad produce la destrucción del tejido de inserción dentario, ocasionando la pérdida de la dentadura natural, con todas las alteraciones psicológicas y sociales que esto implica.⁴

Por consiguiente, en la odontología, el empleo de productos naturales vienen aumentando en los últimos años y gracias a los beneficios presentados por la fitoterapia, es evidente la necesidad de avalar y utilizar medios alternativos, sugiriendo la utilización de la copaiba como un recurso de bajo costo dentro de los programas preventivos y curativos en la odontología para combatir la enfermedad gingival y periodontal.¹

II. Marco Teórico

2.1 .-Antecedentes

1.- Soares et al 2006, realizaron un estudio para evaluar la toxicología clínica del preparado Fito terapéutico conocido como Calmatoss®, un jarabe compuesto por *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *copafeira officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, propóleo y miel. Su principal indicación es para el tratamiento de las afecciones del tracto respiratorio por sus acciones antimicrobianas, antitusígenas, expectorantes y broncodilatadora, así como en faringitis y laringitis. Hicieron un estudio clínico controlado con 24 voluntarios de ambos sexos que recibieron 15ml de jarabe cuatro veces al día, durante 21 días. El jarabe fue bien tolerado y a los exámenes clínicos, electrocardiográficos y de laboratorio, no evidenciaron señales de toxicidad en los diversos órganos y sistemas evaluados, confirmando la seguridad de la preparación para utilizarla en ensayos de eficacia terapéutica.⁵

2.-Pieri et al 2010, evaluaron el potencial del uso del óleo de copaiba (*Copaifera officinalis*) en la prevención de la dolencia periodontal, eliminando su agente etiológico, utilizando 18 canes distribuidos en tres grupos: experimental, el control positivo y el control negativo. Los tratamientos fueron tres veces al día durante 8 días. Luego los animales recibieron fucsina básica para evaluar el biofilm. Se realizaron pruebas de laboratorio de inhibición de adherencia de *Streptococcus mutans* y ensayo antimicrobiano de difusión en agar, sobre bacterias formadoras de placa dental. Al análisis de los ensayos de difusión e inhibición de la adherencia, mostró superioridad el grupo de copaiba en relación a los otros grupos ($p < 0,05$). Concluyeron que el uso del óleo de copaiba en la prevención de la dolencia periodontal es como un posible sustituto de la clorhexidina en la terapia antimicrobiana oral.⁶

3.-Oliveira dos Santos et al. 2008, evaluaron la actividad antimicrobiana de los aceites de copaiba contra bacterias gram positivas y negativas, hongos y

dermatofitos. Obtuvieron los aceites de *Copaifera martii*, *Copaifera officinalis* y *Copaifera reticulata* contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus subtilis* y *Enterococcus faecalis* con una concentración mínima inhibitoria entre 31.3-62.5 $\mu\text{g/ml}$. Los aceites mostraron actividad bactericida, disminuyendo la viabilidad de estas bacterias gram-positivas en 3 horas. Actividad moderada fue observada contra hongos dermatofitos. No mostraron actividad contra bacterias gram negativas y hongos. Concluyeron que, los aceites de copaiba pueden ser fuentes potenciales de nuevos y selectivos agentes para el tratamiento de enfermedades infecciosas importantes.⁷

4.- **Martins Mussi 2011**, realizo pruebas de la concentración mínima inhibitoria y de la concentración mínima bactericida de *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis* relacionadas a la clorhexidina y los aceites derivados de *Copaifeira officinalis* y *Melaleuca alternifolia*. Ensayos fueron realizados para determinar la concentración sub-inhibitoria y la capacidad de esas bacterias para la auto agregación y co-agregación. Como resultados, para la *P.gingivalis*, todas las soluciones probadas inhibieron el crecimiento bacteriano, sin embargo, los resultados obtenidos durante la determinación de la concentración mínima bactericida, mostro que el aceite de copaiba era bacteriostático. Concluyó que todas las soluciones evaluadas tienen cambios relevantes en el normal desarrollo de la *Porphyromona gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* así como influencia en el proceso de auto agregación de *Fusobacterium nucleatum*, pero la Copaiba mostró también propiedades remarcables para cambiar la co-agregación entre las bacterias usadas en este estudio.⁸

5.-**Pieri et al.2008**, el objetivo de su estudio fue identificar la actividad inhibitoria de los óleos de copaiba sobre el crecimiento de los microorganismos: *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus aureus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Haemophilus parasuis*. Fue realizada una

prueba de difusión en agar con dos soluciones al 10% de los óleos de copaiba obtenidos de dos especies (*Copaifera officinalis* y *Copaifera langsdorfii*) y un control negativo con tween 80 y agua. Los aislados clínicos de *H.parasuis* y *A.pleuropneumoniae* fueron incubados en microaerofilia. Los resultados mostraron tres especies gram negativas inhibidas por ambas soluciones: *E.coli*, *P.aeruginosa* y *S.flexneri*. En la inhibición de *P.aeruginosa*, el óleo de *C.officinalis* fue superior al de *C.langsdorfii*. Todas las cepas de *S.aureus* tuvieron su crecimiento inhibido por las soluciones en ensayo, sin diferencia estadística entre los halos. Estos resultados sugieren que el óleo de copaiba puede ser una fuente potencial de compuestos inhibitorios para ser utilizada como antimicrobianos en el tratamiento de las infecciones humanas e animales y en la conservación de los alimentos.⁹

6.-**Reis 2010**, realizó un estudio cuyo objetivo fue evaluar la actividad antimicrobiana de oleos esenciales frente a microorganismos causadores de infecciones bucales, utilizando cepas de *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis* y *Lactobacillus casei*. La actividad antimicrobiana fue evaluada por el método de microdilución en caldo, siendo que las concentraciones de los oleos varían de 2000 a 0.976µg/mL para la determinación de concentración mínima inhibitoria. Posteriormente fue determinada la concentración bactericida mínima, utilizando di clorhidrato de clorhexidina como droga control. Los óleos esenciales más eficaces contra las bacterias en prueba fueron: *Buswellia carteri* (olíbano), *Copaifera officinalis* (copaiba) y *Pogostemon patchouli* (patchouli) para *L.casei* (CIM y CBM de 100, 78 y 78µg/mL, respectivamente); *Copaifera officinalis* y *Santalum álbum* para *S.mitis* (CIM y CBM de 22.5 y 15µg/mL, respectivamente), *Copaifera officinalis* para *S.mutans* (CIM y CBM de 50µg/mL). Mediante los dos valores de CIM y CBM obtenidos, se demostró que esos óleos son agentes antimicrobianos potenciales, agregando resultados para futuros estudios de nuevos compuestos antibacterianos con aplicación en odontología.¹⁰

7.-**Pieri et al 2012**, realizaron un estudio en el que evaluaron la actividad inhibitoria del aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*) contra el microorganismo cariogénico, *Streptococcus mutans*. Para tal propósito, se realizó la prueba de concentración mínima inhibitoria, usando la dilución seriada en la técnica de caldo, con un control negativo, control positivo (0.12% clorhexidina) y solución de oleo de copaiba 10% como prueba. Una prueba de concentración bactericida mínima con tubos presentando crecimiento bacteriano también se realizó. En la prueba de concentración mínima inhibitoria, el aceite de copaiba mostro inhibición del crecimiento bacteriano en todas las concentraciones probadas hasta 0.78µL/mL de la solución del aceite de copaiba al 10% en el caldo. Además, el control negativo no tuvo ninguna inhibición, y la solución del clorhexidina al 0.12% fue efectiva hasta 6.25µL/mL en el caldo. EL aceite de copaiba mostró actividad bacteriostática contra *S.mutans* en bajas concentraciones, y puede ser una opción de agente Fito terapéutico a ser usado contra bacterias cariogénicas en la prevención de la caries dental.¹¹

2.2 .-Bases teóricas

2.2.1 Fitoterapia

La fitoterapia, del vocablo griego fyton (planta) y therapeia (tratamiento) es descrita como una práctica antigua. Fito terapéuticos son sustancias obtenidas a partir de plantas que pueden ser utilizadas como remedios artesanales bajo la forma de soluciones, comprimidos, entre otros, El uso de estas plantas en el tratamiento y en la cura de enfermedades es tan antiguo como la especie humana y los conocimientos de sus efectos fueron pasados por las generaciones, teniendo un importante papel científico e histórico, colaborando incluso en el desenvolvimiento de algunas naciones.¹

El empleo de las plantas medicinales por la población está expandiéndose ya que los medicamentos oriundos de los extractos naturales tienen menor probabilidad de causar efectos colaterales y son más eficaces que los medicamentos alopáticos, además de ser más baratos. Sin embargo, también se sabe que los Fito terapéuticos pueden acarrear efectos colaterales y poseen contra indicaciones, siendo necesario conocer sus principios activos, los aspectos relacionados a las cualidades de la planta y su procedencia a fin de que puedan ser usadas con seguridad.²

2.2.2 Fitoterapia en odontología

El crecimiento mundial de la fitoterapia entre los programas preventivos y curativos ha estimulado la evaluación de los extractos de plantas para el uso en la odontología como control del biofilm dental y otras afecciones bucales.¹

De esta manera, la odontología, es beneficiada por la riqueza en recursos naturales ofrecidos por la flora amazónica y del Brasil, puesto que los productos naturales están cada vez más presentes en los consultorios odontológicos, a pesar de que la fitoterapia sea poco difundida fuera del medio académico.¹

Varias sustancias son utilizadas en la medicina popular como antisépticos, tales como el tomillo y el cacao. Debido a sus propiedades terapéuticas y su uso en el tratamiento de diversas afecciones bucales, tenemos el propóleo que es una resina natural producida por las abejas. Manara et al.(1999) relatan la importancia del propóleo en odontología puede observarse en trabajos relacionados a endodoncia, cariólogía, endodoncia, periodoncia y patología oral.¹²

Afecciones bucales como gingivitis, abscesos e inflamaciones vienen siendo tratadas con Cravo de la India (*Syzygium aromaticum*) por ejemplo. Tenemos extractos de plantas como salvia, menta y manzanilla que están siendo incorporados a fórmulas de dentífricos con el objetivo de reducir la halitosis y combatir la gingivitis.¹

El óleo de copaiba (*Copaifera langsdorffii*) que mostró actividad contra el *Streptococcus mutans*, también posee una actividad analgésica. Los compuestos Fito terapéuticos pueden ser utilizados en variadas fórmulas como capsulas, comprimidos, geles, pomadas, soluciones acuosas, soluciones hidroalcohólicas e infusiones.¹

Segundo Groppo et al (2008) al estudiar el uso de la fitoterapia en odontología, relata que actualmente hay una creciente utilización de estos, pero que más estudios son necesarios para evaluar su seguridad y eficacia en la utilización clínica.¹³

2.2.3 Copaifera

El género Copafeira es constituido por especies de elevado valor económico y ecológico, no solamente en la Amazonía, sino que también en todo el continente sudamericano. Adaptadas a los diversos climas brasileiros, sus árboles exudan un óleo de resina llamado oleo de copaiba, cuyas propiedades biológicas son descritas en la literatura.²

2.2.4 *Copaifera officinalis*

La especie *Copaifera officinalis* fue la primera en ser descrita, por Lineu en 1762. Esta fue, probablemente la especie principal de copaiba cuyos oleos fueron comercializados a través del Caribe en los primeros tiempos de colonización de América.²

En las tres regiones exportadoras de óleos de copaiba son: la región de Belem del Pará en la Amazonia oriental, donde predomina *C.reticulata*, la región del Acre en la Amazonía occidental, donde predomina *C.paupera* y en la región próxima al Manu en la Amazonia central, donde la especie endémica es la *Copaifera multijuga*, el número reducido de especímenes de *Copaifera officinalis* tal vez explique el hecho de que esta sea una de las especies menos estudiadas de este género, a pesar de su importancia económica.²

La semilla de *Copaifera officinalis* cae abundantemente del árbol y no es aprovechada en ninguna forma; en la literatura se encuentran muy pocos estudios acerca de esta especie los cuales están enfocados al análisis de la oleo-resina de su tronco y no se ha encontrado información científica acerca de las semillas y el aceite de las mismas.¹⁴

El canime o copaiba (*Copaifera officinalis*), es un árbol de tronco recto con superficie rugosa que puede alcanzar entre 20 y 30 metros de altura, sus flores son blancas, pequeñas, bisexuales y olorosas, su fruto es dehiscente en dos valvas de color marrón; las semillas son ovoides y pequeñas, de color negro, se encuentran de 1 a 2 envueltas en un arilo de color amarillo; este árbol es originario de Sur América pero también se encuentra en Puerto Rico y Hawaii, es propio de climas tropicales húmedos y secos, de cuya madera se construyen embarcaciones (Silva y Vieira, 2008).¹⁵

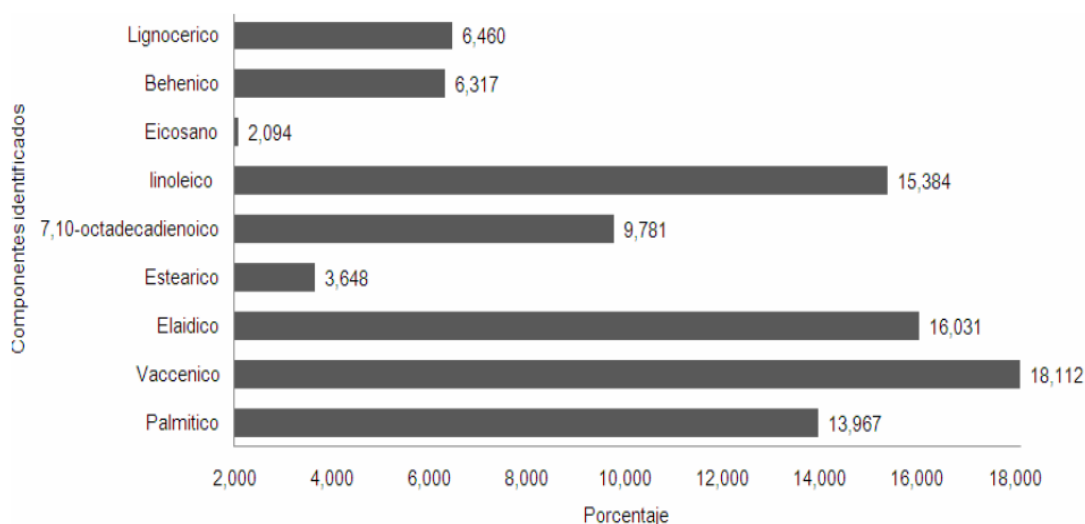
El *Copaifera officinalis* L, es un árbol que pertenece a la familia Caesalpiniaceae y al género *Copaifera*; existen cerca de 70 especies de este género¹⁶ (Chen et al, 2009), las cuales han sido utilizadas ampliamente como árbol maderable y como productor de aceite extraído de la resina del tronco

que ha sido utilizado como fijador de aromas en perfumes y jabones¹⁷ (Sant'Anna et al; 2007) y en la medicina tradicional como antiinflamatorio y analgésico¹⁸ (Matos et al., 2007), antiséptico y cicatrizante de heridas¹⁹ (Brito et al., 2005), con acción citotóxica y anticancerosa²⁰ (Matos et al., 2008), actividad antimicrobiana²¹ (Santos et al., 2008), entre otras.

2.2.5 Composición química

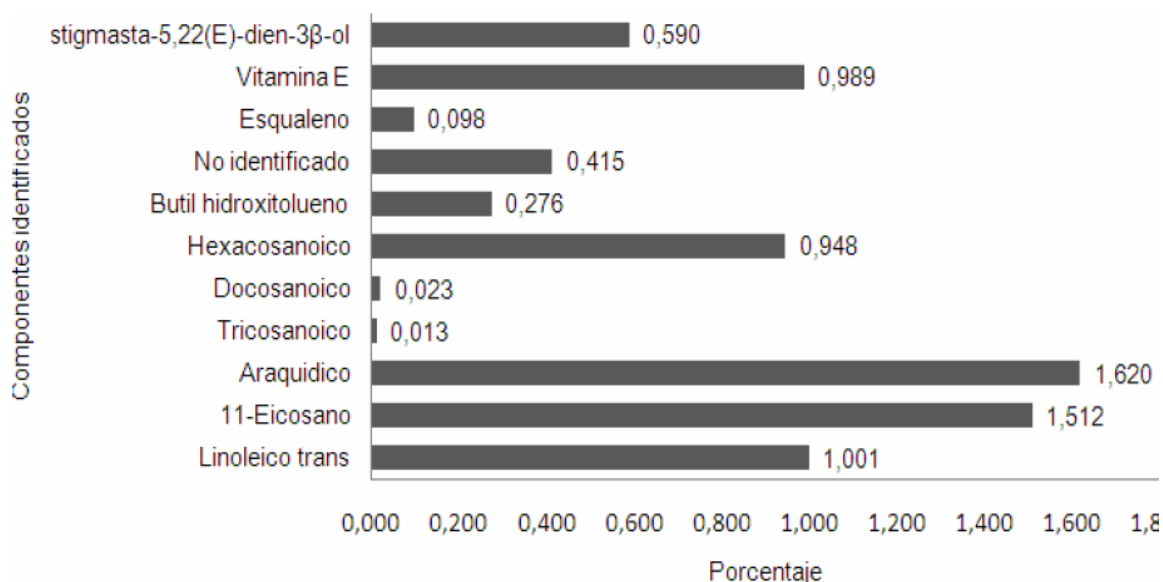
En cuanto al análisis de la composición química del aceite (figura 1) se encontró un total de 96.912% de ácidos grasos, presentando mayor proporción el Vaccenico con 18.112%, Elaidico con 16.031%, linoleico con 15.384%, palmítico con 13.967%, le sigue el 7,10-octadecienoico con 9,781% behénico con 6.317%, lignocérico con 6.460% y el resto en menor proporción; en general se puede decir que presenta el 36.602% de ácidos grasos saturados y el 60.31% insaturados clasificados en monoinsaturados con el 34.143% y diinsaturados con el 26.167%.¹⁴

Fig.1.Composición química del aceite de la semilla de *Copaifera officinalis*



Además de los ácidos grasos también se encontró un 2.2798% de otros compuestos entre ellos, el ácido araquídico y 11-eicosano en mayor proporción, también la vitamina E, el esqualeno y butil hidroxitolueno, estos tres últimos son empleados como aditivos, antioxidantes naturales en alimentos, en industrias cosméticas y farmacéuticas, entre otros usos.¹⁴

Fig. 2. Composición química del aceite de la semilla de *Copaifera officinalis* (0-2)%



2.2.6 Propiedades medicinales de *Copaifera officinalis*

2.2.6.1 Antiinflamatorio

Entre las propiedades medicinales del óleo de copaiba, la más estudiada fue la anti-inflamatoria. Basile et al.1988, estudiaron la actividad del óleo de copaiba comercial, utilizando diversos modelos en ratas. Hubo inhibición del edema inducido, reducción de formación de granuloma y disminución de la permeabilidad vascular ocasionada por la liberación intradérmica de histamina. Los resultados alcanzados indican que el óleo posee actividad antiinflamatoria.²²

2.2.6.2 Antimicrobiano

Los óleos de copaiba de las especies brasileñas *C.martii*, *C.officinalis* y *C.reticulata* exhibieron una actividad contra bacterias gram-positivas. Sin embargo, los óleos testeados fueron inactivos contra bacterias gram negativas.

A pesar de exhibir actividad antibacteriana y tener como componente el óleo cariofileno, que tiene acción germicida, el óleo de copaiba no demostró actividad anti fúngica, en estudio con el género *Candida*.²³

2.2.6.3 Cicatrizante

La aplicación tópica del óleo de copaiba sobre el lecho de la herida, favorece el proceso de multiplicación del tejido granulación, permitiendo el avance del mismo en dirección al centro de la herida, colaborando para el proceso cicatrizal de la lesión. En relación a la extensión de la herida, la aplicación tópica del producto contribuye para la recuperación de la tonicidad muscular, con aumento de la perfusión sanguínea sobre el área donde fue aplicada.²⁴

2.2.6.4 Actividad gástrica

La actividad citoprotectora del óleo de copaiba sobre la mucosa gástrica fue demostrada por medio de la reducción del volumen de secreción ácida gástrica y disminución significativa de la ulcera local inducida por indometacina, al mismo tiempo mejoró la hiperemia y hemorragia de la mucosa gástrica. Además, cuando fue confrontado al omeprazol, el óleo presentó mejor cicatrización.²⁵

2.2.6.5 Actividad renal

Brito, M et al. (2005) evaluaron los niveles de urea y creatinina en ratas sometidas al síndrome de isquemia y perfusión renal y se observó que la administración previa del óleo de copaiba por jarabe durante siete días llevó a niveles más bajos de metabolitos en la orina, sugiriendo la disminución de la permeabilidad vascular a sustancias pro-inflamatorias y disminución de agentes cito tóxicos en el parénquima renal.¹⁹

2.2.6.6 Actividad hepática

El procedimiento de pre-condicionamiento isquémico en el uso de drogas antioxidantes fue estudiado con el objetivo de disminuir la lesión causada por el síndrome de isquemia y re perfusión hepática. El óleo de *C.officinalis*, inhibía el efecto protector del pre condicionamiento.²⁶

2.2.6.7 Antitumoral

El experimento realizado por Chicaro (2009) demostró una posible actividad antitumoral, cuando la viabilidad celular y el número de células presentes en el carcinoma inducido fueron evaluados.²⁷

2.2.6.8 Antinociceptivo

El óleo de copaiba (*Copaifera multijuga* y *Copaifera reticulata*) presentaron actividad antinociceptiva periférica y central, probablemente por medio de receptores opioides en modelos de dolor estimulado por ácido acético.²⁸

2.2.7 Enfermedad gingival

2.2.7.1 .- Generalidades

En la última clasificación de las enfermedades periodontales, elaborada en el año 1999, se acordó incluir una categoría que hiciera alusión a los problemas localizados a nivel gingival; es decir, aquellos que acontecen sobre la encía y que reciben el nombre de enfermedades gingivales.

Las enfermedades gingivales son una amplia familia de patologías diferentes y complejas, que se encuentran confinadas a la encía y son el resultado de diferentes etiologías.²⁹ La característica común a todas ellas es que asientan exclusivamente sobre la encía, no afectan de ningún modo a la inserción no al resto del periodonto, y de ahí que se engloben en un grupo independiente al de la periodontitis.

El interés por las alteraciones gingivales se basa no tanto en su gravedad, sino en su enorme prevalencia entre la población. Los cuadros de inflamación gingival sin alteración del periodonto subyacente se detectan con elevada frecuencia en la población estableciéndose en un rango de 20-50%, variando según la edad, el sexo y raza.³⁰ Se ha visto que conforme aumenta la edad de los sujetos disminuye su prevalencia, lo que implica que el paciente pediátrico o juvenil va a verse especialmente afectado por esta entidad. Del mismo modo, se ha observado que los índices de gingivitis también se diferencian en relación a los factores raciales, y aunque las diferencias entre ambos grupos son pequeñas, la inflamación gingival es más prevalente entre los sujetos de raza blanca.³¹

Las enfermedades gingivales forman un grupo heterogéneo, en el que se pueden ver problemas de índole exclusivamente inflamatoria, como las gingivitis propiamente dichas, pero también alteraciones de origen genético, traumático o asociadas a alteraciones sistémicas, que lo único que tienen en común es el desarrollarse sobre la encía. Hasta la última clasificación de las enfermedades periodontales de 1999, nadie había intentado clasificar las enfermedades gingivales, y se hablaba de gingivitis como de un cuadro inespecífico, con inflamación de la encía y sangrado al sondaje o espontáneo, asociado generalmente a una acumulación de placa. A partir de esta última clasificación, se pretende especificar el origen del cuadro, y se establece una diferenciación principal, relacionada con la asociación o no asociación de la inflamación de la encía con la presencia de placa bacteriana.

De forma general, se habla de las enfermedades asociadas a placa como de gingivitis, aunque este término podría dar lugar a confusión. En realidad el término de gingivitis, que hace referencia al carácter inflamatorio que predomina en estas patologías, no debería emplearse

Posible papel como precursor de pérdida de inserción futura: no está claro, ya que todas las periodontitis se preceden de gingivitis, pero no todas las gingivitis se suceden de una periodontitis.

Es importante destacar que en las gingivitis, la placa siempre está presente en el inicio, aunque no obligatoriamente en grandes cantidades, pero siempre va a ser la encargada de iniciar o exacerbar la severidad de la lesión.

Factores locales o sistémicos pueden modificar la respuesta del huésped ante acúmulos pequeños, provocando una clínica más llamativa incluso en los casos de pequeños depósitos, lo que explicaría los casos en que la placa no es ni cualitativa ni cuantitativamente muy importante y sin embargo se ve una gran inflamación en la encía.

2.2.7.2 .- Características clínicas

Los signos clásicos de la inflamación pueden apreciarse en la inspección visual, lo que facilita el diagnóstico con la simple exploración del paciente. Para su detección es necesaria la sonda periodontal, que ayuda a estimular el sangrado y a detectar el componente inflamatorio de las bolsas. Además, con la sonda descartaremos la existencia de pérdida de inserción, lo cual no confirma el diagnóstico de alteración gingival.

De acuerdo con algunos autores, dependiendo de la localización de los signos en la encía, la gingivitis se puede clasificar en generalizada o localizada, según esté afectando todos los dientes de la boca, o solo altere la encía que rodea a un grupo determinado o a un diente exclusivamente.

Existe en la literatura un artículo que sentó las bases del conocimiento de la gingivitis tal y como se entiende en la actualidad, se trata del estudio de la "Gingivitis experimental".³² Con él, quedaron definidos una serie de conceptos fundamentales acerca de esta entidad:

1. **Origen bacteriano** de la gingivitis: tras su investigación, Loe y Thilander plantearon que la gingivitis se produce como consecuencia de la exposición de los tejidos a la placa, lo que desencadena la ya mencionada respuesta inflamatoria que se traduce clínicamente en una

gingivitis. Cualquier individuo al que se le prive de medidas de higiene, acaba desarrollando gingivitis.

2. **Reversibilidad** del cuadro: en sus estudios sobre el modelo de gingivitis experimental, demostraron además la reversibilidad de esta condición. Como se ha comentado anteriormente, es posible inducir la aparición de gingivitis tras la privación de medidas de higiene, pero si se reinstauran, el cuadro revierte y recupera el estado de salud.³²

2.2.7.3 .- Clasificación

Dentro de la clasificación, las entidades que más pueden afectar al paciente pediátrico van a ser las siguientes:

Gingivitis asociadas a placa, tanto con o sin otros factores locales asociados. Es frecuente que el paciente infantil no domine las técnicas de cepillado, y eso le haga retener gran cantidad de placa. Sin embargo, con una correcta instrucción acerca de las técnicas de higiene dental e interproximal, el proceso podría ser autolimitado y no acarrear problemas en el futuro. Por otro lado, ciertos factores locales, como la aparatología fija de ortodoncia, dificultan el cepillado y la respuesta gingival puede ser incluso más llamativa. En este caso, el correcto desbridamiento y el seguimiento del niño durante el tratamiento resultarán imprescindibles, ya que en ocasiones, la incapacidad del paciente de mantener un óptimo estándar de higiene, puede acarrear el desarrollo de agrandamientos de la encina de tipo fibrótico, que solo se resolverán con el tratamiento quirúrgico.

De acuerdo con estudios recientes, el tratamiento con aparatología fija aumenta de forma temporal los índices periodontales y estimula el crecimiento de las bacterias periodontopatógenas, sin embargo, no parece tener efectos destructivos en la parte más profunda del periodonto, sino que se trata de una afectación más superficial.³³

-Gingivitis modificada por factores sistémicos, como es el caso de las modificaciones que genera el sistema endocrino.

El embarazo, la pubertad y los ciclos menstruales son circunstancias del sistema endocrino que en un momento dado pueden alterar la homeostasis del periodonto y provocar un aumento de la susceptibilidad a la placa, que tendrá como resultado la aparición de una alteración gingival visible clínicamente.²⁹

Se trata de un factor de tipo general que provoca una hiper respuesta ante la placa. Es necesaria la conjunción de placa y hormonas esteroideas para que aparezca la gingivitis, pero no es necesaria una composición específica de la placa para que se desarrolle la alteración gingival en estos pacientes.

Ejemplo típico de este hecho es la gingivitis propia de los adolescentes. El aumento brusco de hormonas durante la pubertad genera un cuadro con características clínicas similares al de la gingivitis debida exclusivamente a placa, pero en ausencia de grandes depósitos que puedan justificar una clínica tan florida.²⁹

-Gingivitis modificadas por factores sistémicos, como es el caso de las modificaciones que generan las discrasias sanguíneas.

Ciertas patologías de la sangre, entre las cuales suele citarse leucemia como ejemplo, pueden asociarse a la gingivitis. De hecho, las lesiones orales de estos cuadros pueden ser uno de los primeros signos en aparecer, y su detección precoz podría ayudar al diagnóstico temprano de la enfermedad sistémica. La evidencia de esta asociación está en la literatura actual. Estudios llevados a cabo recientemente describen una inflamación gingival moderada asociada a todos los casos de leucemia linfoblástica en el paciente pediátrico, por ejemplo.³⁴

En estos casos, pueden verse: linfadenopatías, petequias a nivel de la mucosa o úlceras, pero se citan dentro de este apartado por estar asociadas en gran cantidad de ocasiones a problemas gingivales. El sangrado al sondaje es un signo frecuente en estos pacientes, así como los agrandamientos

gingivales, que a veces también pueden identificarse en los individuos con leucemia y otras discrasias sanguíneas.

-Enfermedades gingivales modificadas por la nutrición. La malnutrición puede comprometer el sistema inmunológico del paciente e interferir de esta manera en la susceptibilidad del individuo al ataque bacteriano, lo cual lleva a pensar que la repercusión clínica ante la exposición a placa en estos pacientes podría verse exacerbada. Sin embargo, no existen muchos estudios concluyentes a este respecto, y no se pueden extraer conclusiones demasiado definitivas sobre este apartado.

Parece claro que las condiciones inadecuadas de higiene y malnutrición suponen una agresión para el paciente infantil, tal y como se ha visto en estudios llevados a cabo en comunidades desfavorecidas, a partir de los que se ha deducido que estas condiciones predisponen al niño a las enfermedades gingivales.³⁵

2.2.7.4 .- Tratamiento

Tal y como señalaron Loe y Thilader en sus estudios sobre la gingivitis experimental, las enfermedades gingivales asociadas a placa son condiciones reversibles que desaparecen una vez se elimina la causa.³² Cabe deducir que, si el principal factor etiológico de todos estos cuadros es la presencia de acúmulos de placa, su eliminación será la base del tratamiento que debemos ofrecer a los pacientes.

Ahora bien, ocurre que, de acuerdo con todo lo anteriormente recogido, ciertos factores generales y locales pueden exacerbar y modificar la respuesta del paciente a la presencia de la placa, y la enfermedad gingival ser el resultado de ambas circunstancias, no solo de la placa en si, por lo que se hace además necesario el control de los factores concomitantes para la resolución de la gingivitis.

En el caso de los agrandamientos gingivales, la eliminación de placa ha demostrado ser insuficiente en la resolución del cuadro, por lo que habrá que optar por hacer un recontorneado quirúrgico de la encía. Sin embargo, es importante tener presente que las recurrencias van a ser casi inevitables mientras persista el fármaco que las originó, por lo que realizar interconsultas con el especialista que trata al paciente serán necesarias para que intente modificar la medicación y solucionar el problema.

2.2.8 Enfermedad Periodontal

2.2.8.1 .-Generalidades

La importancia de la prevención, importancia y tratamiento precoz de los problemas periodontales en el niño se basa fundamentalmente en cinco puntos de especial interés³⁶:

1. La prevalencia y severidad de las enfermedades periodontales en el niño son altas.
2. Las enfermedades incipientes en el niño pueden evolucionar a enfermedades periodontales avanzadas en la edad adulta.
3. Existe asociación entre las enfermedades sistémicas y enfermedades periodontales.
4. Los pacientes, familias y población de riesgo deberían ser identificados e incluidos en programas específicos de prevención y tratamiento.
5. El tratamiento y prevención de las mayorías de las enfermedades periodontales son relativamente simples y muy efectivos y lo que es más importante, procuran beneficios a largo plazo.

A lo largo de las últimas décadas, la nomenclatura y clasificaciones usadas para describir las enfermedades periodontales han cambiado periódicamente.

Se ha pasado del consenso del World Workshop de 1989 (AAP 1989) que se basaba fundamentalmente en la edad de aparición, ratio de progresión,

distribución de las localizaciones afectada, presencia o ausencia de condiciones sistémicas y respuesta a la terapia a la clasificación más actual propuesta en el Workshop International de 1999³⁷ que incluye una gran variedad de categorías basadas en el diagnóstico clínico dando menos importancia a la edad de aparición. Por lo tanto, cuando antes se hablaba de determinados cuadros específicos en niños como la periodontitis prepuberal y periodontitis juvenil ahora estas se engloban dentro de los cuadros de periodontitis agresivas o periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas que independientemente de la edad pueden diagnosticarse tanto en niños como en adultos.

Clasificación de la Periodontitis

World Workshop, 1989	
I	Periodontitis del adulto
II	Periodontitis de comienzo temprano
	A- Periodontitis prepuberal (localizada y generalizada)
	B- Periodontitis juvenil (localizada y generalizada)
	C- Periodontitis de progresión rápida
III	Periodontitis asociadas a enfermedades sistémicas
IV	Periodontitis ulceronecrotizante
V	Periodontitis refractarias
1er. Workshop europeo, 1994	
I	Periodontitis de comienzo temprano
II	Periodontitis de adulto
III	Periodontitis necrotizantes

International Workshop, 1999

- I Enfermedades gingivales
- II Periodontitis crónica
- III Periodontitis agresiva
- IV Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas
- V Enfermedades periodontales necrotizantes
- VI Abscesos del periodonto
- VII Periodontitis asociadas a lesiones endodónticas
- VIII Condiciones y deformidades del desarrollo o adquiridas.

2.2.8.2 .- Epidemiología

Muy pocos estudios han aportado datos sobre la prevalencia de las periodontitis que afectan a la primera dentición en niños con pérdida de dientes (clásicamente llamadas periodontitis prepuberales); además, los criterios usados en los escasos estudios no son uniformes lo que hace que la prevalencia varíe de forma considerable en un rango del 0,8% (Sweeney 1987) al 25%.³⁸

Por otro lado, los estudios epidemiológicos de las periodontitis agresivas (clásicamente llamadas periodontitis juvenil) en niños y adolescentes han usado criterios más uniformes contemplando por un lado las lesiones óseas con radiografías de aleta y corroborando el diagnóstico con datos clínicos.

Los estudios muestran que la periodontitis agresiva localizada varía geográficamente. Así, en caucásicos, parece que es más frecuente en niñas siendo la prevalencia baja (0,1%). La raza negra presenta una mayor prevalencia de esa enfermedad (1%) afectando con mayor frecuencia a los niños. Estos estudios confirman que los factores como el tabaco y el nivel

socioeconómico bajo se asocian con la presencia de periodontitis agresiva en varias poblaciones.³⁹

Otros trabajos han tratado de corroborar la posibilidad de que la periodontitis agresiva localizada y la periodontitis prepuberal están asociadas, es decir, de que ésta última se trate de una evolución de la primera. De este modo, la mayoría de los estudios sostienen que en jóvenes con periodontitis agresiva, la enfermedad comienza en el hueso mesial del diente deciduo en el lugar donde posteriormente erupcionará el primer molar permanente.⁴⁰

2.2.8.3 .- Diagnóstico

2.2.8.3.1 Historia clínica

La historia junto con el examen clínico, son la base del diagnóstico de la condición periodontal en el que debe abarcarse tanto el niño o adolescente como los padres o cuidadores al cargo.⁴⁰

2.2.8.3.2 Examen periodontal

El screening periodontal en niños y adolescentes debe ser un método simple, rápido y bien tolerado por el paciente para identificar problemas periodontales que indique al clínico la necesidad de tratamiento o de una valoración más detallada.

En 1992, la ADA (American Dental Association) y AAP (American Academy of Periodontology) introdujeron el screening y registro periodontal (examen básico periodontal) al odontólogo general recomendando su uso en todos los pacientes como parte del examen integral oral. El “screening” y registro periodontal no es más que la utilización del CPITN (Community Periodontal Index of Treatment Needs) usado previamente como una herramienta epidemiológica de screening. Este, aunque no sustituya el examen clásico periodontal, registra en seis puntos por diente la pérdida de inserción, profundidad de sondaje, sangrado al sondaje, recesiones, furcaciones y movilidad. El propósito es determinar pacientes que podrían beneficiarse de un

examen más detallado y de una terapia más compleja de forma sencilla, rápida y costo efectiva.

Tras la erupción de los incisivos y primeros molares permanentes, el screening se puede realizar en los dientes 16, 11, 26, 36, 31 y 46. En cuanto a la frecuencia de toma de registros en jóvenes, falta información. Debido a la sencillez, rapidez y grado de aceptación del examen básico periodontal, parece prudente recomendar realizar screening periodontal a todas las nuevas visitas y cada 4 -6 meses en las visitas de revisión para poder detectar de forma precoz cualquier problema periodontal y tratarlo adecuadamente.

2.2.8.3.3 Radiografías

Debido a los efectos acumulativos de la radiación durante la vida de los pacientes, la decisión de realizar radiografías en el paciente joven debe de ser conservadora y justificable. Las radiografías deben de tomarse cuando está clínicamente justificado debido al posible cambio en el manejo y pronóstico del paciente.

La utilización de radiografías, sobre todo de aletas para la detección de los niveles óseos ha sido recomendada recientemente como suplemento del examen clínico. En niños y adolescentes, nos aporta de forma fácil información acerca de los niveles óseos crestaes al igual que diagnóstico de caries y además, nos permite monitorizar los cambios óseos a lo largo del tiempo.⁴⁰

La radiografía panorámica puede ser de gran valor a la hora de determinar la presencia o ausencia de los dientes permanentes y la localización de los dientes no erupcionados que condicionaría un futuro tratamiento ortodóncico. La radiografía panorámica nos da igualmente la oportunidad de valorar los niveles óseos y los posibles patrones de pérdida ósea.⁴⁰

2.2.8.3.4 Estadios de la Historia Clínica del paciente periodontal joven.

1. Causa de la visita <ul style="list-style-type: none">• Revisión de rutina• ¿Referido?• ¿Presenta problemas?
2. Historia de la razón de la visita <ul style="list-style-type: none">• Inicio, duración, severidad de la causa.
3. Historia dental pasada <ul style="list-style-type: none">• Regular / irregular• Tratamiento previo• ¿Ha tenido analgesia local?• ¿Tiene asesoramiento preventivo?
4. Historia médica pasada <ul style="list-style-type: none">• Historia médica completa• Factores de riesgo sistémicos para la enfermedad periodontal (diabetes, tabaco)• Es un niño de riesgo para el examen periodontal (enfermedades congénitas, cardíacas, etc.)
5. Historia Social <ul style="list-style-type: none">• Disponibilidad• Motivación del niño y de los padres• Régimen de control de placa

Tomado de Boj de odontopediatría: La evolución del niño al adulto joven, Madrid, Editorial Medica Ripano, 2011.

2.2.8.3.5 Profundidad de sondaje y pérdida de inserción.

La presencia de bolsas periodontales es una característica de periodontitis incipientes y bolsas de 4 -5 mm o más pueden ser detectadas en las localizaciones afectadas. Hemos de tener en cuenta que también podemos

encontrar bolsa en zonas donde no hay pérdida de inserción, es decir, en ausencia de migración apical del epitelio de unión más allá de la unión amelocementaria. Esto podría deberse a una destrucción pequeña no detectable en ese momento o a la inflamación coronal del margen gingival (pseudobolsa).

La discusión sobre lo que se considera “distancia normal” de la unión amelocementaria a la cresta ósea ha sido ampliamente estudiado en la literatura. Algunos autores afirman que cuando esta es igual o mayor de 2 mm ya existe pérdida de hueso.³⁹ En la periodontitis incipiente del adulto la pérdida de hueso crestral es generalmente horizontal pero esta puede, en jóvenes, afectar algunas localizaciones presentándose en éstos, pérdida vertical o angular de hueso que si afecta al menos un molar deben de considerarse como sujetos con riesgo periodontal.

2.2.8.3.6 Diagnóstico microbiológico

Las bacterias son necesarias para el desarrollo de la periodontitis pero solo un número pequeño de ellas está relacionada con la etiología y progresión de la infección periodontal. Su identificación sería necesaria para alcanzar, dentro de nuestro tratamiento anti-infeccioso, nuestros objetivos microbiológicos de eliminación de patógenos exógenos y reducción de bacterias comensales.⁴

Además, el diagnóstico microbiológico nos permite realizar una clasificación etiológica de la periodontitis, la detección de pacientes / localizaciones con enfermedad activa, la identificación de pacientes/ localizaciones con mayor riesgo futuro de iniciación o progresión de enfermedad y la identificación del factor etiológico principal: el microbio.

La importancia de conocer las bacterias implicadas en la periodontitis radica en las diferentes susceptibilidades que presentan ante los diferentes tratamientos porque no todos los pacientes responden igual al tratamiento periodontal debido a la presencia de diferentes patógenos y a factores ambientales y del hospedador.⁴

La toma de muestras se realiza mediante puntas de papel y éstas pueden ser aisladas o agrupadas, únicas o múltiples, pero es de crucial importancia la selección de las localizaciones en función de una serie de criterios clínicos y radiológicos. De este modo, la toma de muestras en bolsas profundas, con sangrado al sondaje, linguales- palatinas y ausencia de integridad de la lámina dura aumentan las posibilidades de detectar los periodonto-patógenos involucrados. En todo caso, se debe evitar la contaminación por placa supragingival y de saliva.⁴

El procesamiento de las muestras descritas para la detección de patógenos periodontales puede realizarse mediante examen directo de la placa (microscopia de contraste de fase y de campo oscuro), cultivo bacteriano, pruebas inmunológicas y técnicas moleculares (sondas de ADN, reacción en cadena de la polimerasa (PCR)).⁴

2.2.8.3.7 Cultivo

El cultivo bacteriano es el procedimiento de referencia y es a partir del cual se compara y se validan las demás técnicas. Sus dos mayores ventajas son la capacidad para identificar a la mayoría de microorganismos, y la posibilidad de evaluar susceptibilidades a antimicrobianos. Sus defectos son los requerimientos de tiempo, dinero, habilidades, personal y conocimientos, y la imposibilidad de cultivar algunos microorganismos como ciertas espiroquetas.⁴

Las muestras se transportan en un medio que debe mantener la viabilidad, no favorecer el crecimiento y conservar condiciones de anaerobiosis. En la cavidad oral se utilizan dos tipos principalmente, uno con factores nutritivos e inhibidores de crecimiento (la serie de VGM desarrollada por Möller), y otro con una solución salina tampón no nutritiva (RTF de Syed & Loesche).

Las bacterias forman agregados que deben de romperse para que puedan cultivarse. La dispersión se puede hacer mediante sonicación,

agitación (Vortex), o con la ayuda de cuentas de collas. Una vibración excesiva puede destruir ciertas bacterias.

Dado que los números de bacterias en las muestras son muy elevadas, es necesarias diluirlas para obtener placas con entre 30 y 300 colonias.

La incubación variará según los requerimientos de las bacterias a estudiar, que pueden ser: aerobio (ambiente normal), anaerobio (en ausencia de oxígeno), microaerófilico (con oxígeno reducido), anaeróbico facultativo (puede crecer en aerobiosis o anaerobiosis, capnófilico (requiere dióxido de carbono).⁴

Los medios de cultivo incluyen diferentes ingredientes necesarios para el crecimiento de las bacterias, pudiendo ser huéspedes humanos o animales, cultivos de células o tejidos, medios sintéticos o semi-sintéticos, ya sea en forma de polvo deshidratado o de medio preparado. Pueden ser no-selectivos, para buscar el crecimiento de todas las bacterias presentes, en las mismas proporciones en la que estén en las muestras; selectivos, que contienen antibióticos y tinciones para solo permitir el crecimiento de una especie en concreto. La sensibilidad de los métodos de cultivo frente a bacterias estudiadas es de $10^4 - 10^5$ cuando se utilizan medios no selectivos y de 10^3 cuando se utilizan medios selectivos. Pueden utilizarse medios enriquecidos, para favorecer el crecimiento de las bacterias más abundantes, de soporte, para dejar crecer en las proporciones reales a la mayoría de bacterias de requerimientos sencillos diferencial, para establecer identificaciones morfológicas selectivas.⁴

La identificación se realiza en base a diferentes criterios que se aplican de manera sucesiva hasta alcanzar una identificación de presunción (con cierto grado de seguridad) ya que la identificación definitiva puede requerir procesos muy laboriosos (Morfología de la colonia, hallazgos al microscopio, tolerancia al oxígeno, caracterización bioquímica y análisis de DNA)⁴

2.2.8.3.8 Etiopatogenia

El concepto actual de la etiología multifactorial de las enfermedades periodontales establece que éstas son producidas por una interacción de un agente microbiano único o múltiple considerado como el factor etiológico primario necesario pero no suficiente, un huésped más o menos susceptible y unos factores ambientales que influyen sobre ambos. De este modo puede inferirse que el hecho que aparezca una enfermedad de este tipo en un niño suele tener que ver con una inmunidad defectuosa o una incapacidad para defenderse de la agresión de las bacterias.⁴

2.2.8.3.9 Tratamiento

La AAP⁴ desarrolló una serie de parámetros a seguir a la hora de tratar las periodontitis agresivas y puntualizaron lo siguiente:

- El fin del tratamiento es el mismo que para la periodontitis de tipo crónico, que no es común detectarlas en niños: disminuir o eliminar la etiología microbiana y los factores de riesgo contribuyentes y regenerar el aparato de inserción.
- Los métodos de tratamiento son similares a los de la periodontitis crónica, y esto incluye el tratamiento etiológico de la infección, con limpieza y desbridamiento de la zona, pero además deben considerarse lo siguiente:
 1. Evaluación sistémica del paciente para descartar enfermedades sobretodo en niños y adolescentes.
 2. La terapia inicial como único tratamiento suele ser inefectivo.
 3. Los resultados al tratamiento a largo plazo dependerán de la implicación del paciente y de los intervalos de mantenimientos. Cuando se afecten dientes temporales, los dientes permanentes deben ser monitorizados para detectar posibles pérdidas de inserción futuras.
 4. Debido a la asociación familiar, se recomienda el asesoramiento y evaluación de los miembros de la familia del afectado.

2.2.8.4 .- Manifestación de enfermedades sistémicas

Enfermedades sistémicas relacionadas con la enfermedad periodontal

A. Anomalías hematológicas

1. Inmunodeficiencias primarias:

- Déficit de anticuerpos
- Disfunción de fagocitos
- Otros desordenes que afectan a neutrófilos

2. Inmunodeficiencias secundarias /fármacos

Inmunosupresores:

- Quimioterapia
- Enfermedades por VIH
- Tumores

B. Anomalías no hematológicas

- Diabetes Mellitus.
- Histiocitosis de células de Langerhans.
- Hipofosfatemia.
- Síndrome de Ehlers-Danlos.
- Síndrome de Down.

Son pocos los casos en los que la destrucción del periodonto es avanzada y puede conllevar la pérdida de los dientes. Cuando esta destrucción acontece en niños suele asociarse a una condición sistémica que compromete la respuesta del huésped a las bacterias de la placa. En estos casos la alteración del sistema inmune puede ser consecuencia de una inmunodeficiencia primaria, del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o de una terapia inmunosupresora. En niños con inmunosupresión severa las

bacterias de la cavidad oral pueden dar lugar a una septicemia u otras infecciones que pueden comprometer la vida del paciente.⁴²

Las patologías que aumentan la susceptibilidad del huésped a las bacterias de la placa y, por consiguiente, a la pérdida ósea y a la exfoliación prematura de los dientes se exponen en el cuadro de este apartado.

Los trastornos sistémicos que pueden presentar una enfermedad periodontal rápidamente destructiva pueden ser divididos en aquellos pacientes que presentan anomalías hematológicas y los que no. Las anomalías hematológicas frecuentemente implican una alteración en la función leucocitaria o en su número e incluye desórdenes en los neutrófilos, macrófagos y linfocitos T. Las enfermedades no hematológicas que afectan periodonto del niño son la diabetes, la hipofosfatemia, la histiocitosis de células de Langerhans y otros síndromes genéticos.⁴³

2.2.8.4.1 Anomalías hematológicas

2.2.8.4.1.1 Déficit linfocitarios de linfocitos T y deficiencias combinadas

Muchos desórdenes hereditarios de las células T en la infancia se asocian a mayor predisposición a sufrir periodontitis. Aunque la causa de esta asociación es aún controvertida, la hipótesis de una producción descontrolada de citoquinas por las células T alteradas es la más aceptada. Además, es probable que existan alteraciones humorales secundarias y alteraciones de neutrófilos en las disfunciones severas de células T.⁴³

2.2.8.4.1.2 Déficit de anticuerpos

La evidencia científica no aclara la asociación entre determinados déficits de anticuerpos (como la Agammaglobulinemia) y la periodontitis en niños.

2.2.8.4.1.3 Déficit de adhesión leucocitaria

Está caracterizada porque los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) no son capaces de adherirse o emigrar correctamente en presencia incluso de los factores quimiotácticos adecuados. Los pacientes con este déficit suelen tener

una neutrofilia de base y la característica más frecuente es una periodontitis de progresión rápida y exfoliación temprana de los dientes.⁴⁴

2.2.8.4.1.4 Enfermedades granulomatosas crónicas

Son un grupo de alteraciones genéticas en las que los neutrófilos, monocitos, basófilos, eosinófilos y macrófagos son capaces de fagocitar pero no de eliminar ciertas bacterias. Estos casos suelen presentar gingivitis severa, aunque la destrucción periodontal es poco frecuente.⁴³

2.2.8.4.1.5 Síndrome de Chedlak Higashi

Es un síndrome raro, menudo fatal, de carácter autonómico recesivo con gránulos lisosomales gigantes en los leucocitos. Afecta típicamente a niños pequeños y se trata con trasplante medular, lo que elimina la predisposición a sufrir periodontitis. Las formas leves tienen una aparición más tardía y desarrollan periodontitis avanzadas antes de ser diagnosticadas.⁴³

2.2.8.4.1.6 Otros desórdenes que afectan al número de neutrófilos y/o macrófagos:

Agranulocitosis congénita

Además de las alteraciones de la función de los neutrófilos, hay desórdenes asociados a una disminución en su número (neutropenia). Casi todos los pacientes con agranulocitosis congénita tienen frecuentes enfermedades infecciosas, siendo la periodontitis una de las más frecuentes.⁴³

Neutropenia cíclica

Poseen un defecto en la maduración de las células pluripotenciales, y se caracterizan por desarrollar episodios cíclicos de disminución en el número de neutrófilos. Este tipo de pacientes suele desarrollar periodontitis de progresión rápida.⁴³

2.2.8.4.2 Anomalías no hematológicas

2.2.8.4.2.1 Diabetes Mellitus

La Diabetes Mellitus, tanto tipo 1 como tipo 2, han sido ampliamente asociada a enfermedad periodontal. Los pacientes diabéticos han mostrado tener mayor prevalencia, incidencia y severidad de las patologías periodontales que los no diabéticos. Además, la relación entre Diabetes Mellitus y periodontitis es bidireccional, y los pacientes diabéticos con periodontitis suelen obtener una mejora de su control metabólico tras el tratamiento periodontal.⁴³

2.2.8.4.2.2 Histiocitosis de células de Langerhans

Está caracterizada por una excesiva proliferación de las células de Langerhans derivadas de la médula ósea. Los pacientes suelen presentar la triada: diabetes insípida y lesiones osteolíticas. La destrucción periodontal suele ser muy rápida y conlleva la exfoliación temprana de los dientes. Las imágenes radiográficas se conocen como en "dientes flotantes".⁴³

2.2.8.4.2.3 Hipofosfemia

Es una condición ligada a la disminución de las fosfatasas alcalinas en suero, que están relacionadas con el potencial de mineralización. A nivel dental se caracteriza por una ausencia de cemento y taurodontismo. Suelen sufrir una exfoliación temprana de la dentición temporal y permanente.⁴³

2.2.8.4.2.4 Síndrome de EhlerS-Danlos

Es un grupo heterogéneo de alteraciones del tejido conectivo caracterizado por una marcada elasticidad cutánea, fragilidad tisular e hiperlaxitud articular. Es un Síndrome congénito asociado a la reabsorción periodontal severa.⁴³

2.2.8.4.2.5 Síndrome de Down

Es una enfermedad hereditaria resultado de la trisomía del cromosoma 21, y es causa frecuente del retraso mental en niños. Suele estar asociada a patología periodontal, aunque los mecanismos por los que esto ocurre todavía son controvertidos.⁴³

2.2.8.4.2.6 Síndrome de Papillon-Lefèvre

Estos pacientes presentan una alteración cualitativa de los neutrófilos, que muestran alteraciones en la quimiotaxis y en la producción de superóxido. Esta alteración es debida a la mutación del gen que codifica la catepsina C. El síntoma clínico típico es la hiperqueratosis palmoplantar. La periodontitis de progresión rápida es un hallazgo muy frecuente, y suele conllevar la pérdida de los dientes.⁴³

2.2.8.5 .- Correlación con enfermedades sistémicas

Las enfermedades periodontales pueden ser un riesgo para la salud sistémica. Diversos estudios epidemiológicos han evaluado la asociación entre infección periodontal y enfermedades sistémicas, determinando que estas infecciones pueden ser factor de riesgo adicional para enfermedades cardiovasculares, osteoporosis, *Diabetes Mellitus*, infecciones respiratorias en el adulto mayor, parto prematuro y bajo peso al nacer, incrementando la morbilidad y la mortalidad derivadas de estas enfermedades. La susceptibilidad a enfermedades periodontales está determinada genéticamente.⁴³

2.2.8.5.1 Diabetes Mellitus

Los dos tipos de diabetes incrementan la probabilidad de desarrollar enfermedad periodontal y agravan la destrucción periodontal. Por otro lado la periodontitis severa y generalizada puede afectar adversamente el control metabólico de la diabetes. Se ha encontrado que en pacientes con niveles de hemoglobina glicosilada por encima de lo normal (>7), el tratamiento periodontal facilita el control metabólico a niveles normales.⁴⁵

En el paciente diabético la interacción que se presenta entre los productos terminales de la glicolización oxidativa (AGEs) y los receptores a nivel celular y endotelial (Rage) puede desencadenar la liberación de altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias, como la IL-1 y el TNF α , la producción exagerada de colagenasas y una disminución en la permeabilidad vascular,

eventos que su vez pueden ocasionar la destrucción tisular y la pérdida del soporte óseo.⁴⁵

2.2.8.5.2 Prematuridad y bajo peso al nacer

Algunos estudios han demostrado que los factores de riesgo del parto pretérmino son múltiples. Numerosos microorganismos, incluyendo anaerobios como fusobacterias, especies de bacteroides y estreptococos anaerobios, entre otros, han sido recuperados del tracto vaginal y del fluido⁴⁶ amniótico en mujeres con parto de trabajo pretérmino y ruptura pretérmino de membranas.

Las personas con la encía inflamada pueden tener bacteremias transitorias que pueden alcanzar los tejidos placentarios, proporcionando el impulso inflamatorio (contracción de músculo liso) para la inducción del trabajo de parto.⁴⁷ Se ha reportado en cultivos del fluido amniótico de mujeres con vaginosis especies de fusobacterias las cuales son constituyentes comunes de la microbiota periodontal. Dada la estrecha relación entre la inflamación y la infección parece factible que un incremento en los niveles de algunos promotores de la inflamación, como las prostaglandinas y las citoquinas producidas por la respuesta normal del huésped a un agente infeccioso pueden representar el mecanismo clave a través del cual la infección (en este caso la Periodontitis), se relacione con el bajo peso al nacer y el parto prematuro.⁴⁸

2.2.8.5.3 Enfermedades cardiovasculares

La Ateroesclerosis ha sido definida como una enfermedad progresiva que involucra los músculos de tamaño grande a mediano y las arterias elásticas largas. La Ateroesclerosis puede conducir a una enfermedad coronaria, así como infartos cerebrales y del miocardio. Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en todo el mundo y los factores de riesgo multifactoriales son muy importantes para diferentes especialidades entre ellas la medicina interna.⁴⁸ Los componentes estructurales de las bacterias periodontopáticas como los lipopolisacáridos estimulan la producción local de mediadores inflamatorios como la IL-1, TNF- α , IL-6 y la

proteína C Reactiva. La Enfermedad Periodontal se ha propuesto que es capaz de ser un factor a tener en cuenta en la enfermedad vascular dada la abundancia de especies gram-negativas envueltas, la rápida detección de niveles de citoquinas pro-inflamatorias en el fluido crevicular, el infiltrado denso de células inmunes envueltas, la asociación de fibrinógeno periférico y la suma de células blancas además de la extensión y cronicidad de la enfermedad.⁴⁸

Existen evidencias de que, por lo menos, hay cuatro probables mecanismos involucrados en la asociación de EP y ECV. Estos mecanismos son:

1. Efecto de bacterias bucales sobre las plaquetas

Organismos bucales y periodontales como *P. gingivalis* y *S. sanguis* pueden expresar factores de agregación de plaquetas *in vitro* e *in vivo*, lo que puede facilitar e iniciar la formación de trombos.⁴⁹ Trombos secundarios a la acción de patógenos bucales pueden exacerbar la progresión de ateromas y promover eventos isquémicos.

2. Disfunción endotelial a distancia por efectos de mediadores proinflamatorios producidos en la enfermedad periodontal

La inflamación y el daño tisular de tejidos periodontales inducen producción de citoquinas proinflamatorias (interleukinas 1, factor de necrosis tumoral-alfa, prostaglandina E2). Estos mediadores inflamatorios pueden alterar la homeostasis vascular a distancia.

La proteína C-reactiva y el fibrinógeno, que están aumentados en muchos pacientes con enfermedad periodontal pueden inducir eventos como adhesiones intercelulares por expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) y formación de coágulos. Las proteínas de fase aguda, en especial, la proteína C-reactiva (P-CR), se ha demostrado que es un factor de riesgo para ECV, incluyendo infarto del miocardio y accidente vascular encefálico.⁴⁹

3. Respuesta autoinmune por acción de proteína heat-shock, que son proteínas presentes en bacterias y en humanos

El alto grado de homología entre proteína HSP 60 de humanos y bacterias sugiere que mecanismos autoinmunes pueden estar involucrados en varias enfermedades crónicas, incluida la enfermedad periodontal.

La proteína HSP 60 se encuentra en *O. gingivalis* y en *A. actinomyces-temcomitians* y también en tejidos periodontales. Los tejidos del miocardio y de ateromas dañados pueden también liberar proteínas HSP 60 e incluir respuestas autoinmunes.⁴⁹

Se ha sugerido que la periodontitis crónica podría contribuir a aumentar la carga total de infección y, de este modo, contribuir al desarrollo de aterosclerosis.

Estudios recientes han sugerido una respuesta autoinmune o de reacción cruzada a proteína HSP 60 en EP y en ECV. Se han identificado anticuerpos que reaccionan en forma cruzada con patógenos periodontales y proteínas *heat-shock* que pueden explicar eventos inflamatorios en ECV.

4. Daño tisular por invasión de patógenos bucales del endotelio arterial

Se ha demostrado invasión de *P. gingivalis*, *T. forsythensis* y *A. actinomyces-temcomitians* en placas de ateroma en humanos.⁴⁹

2.2.8.5.3.1 Endocarditis

La endocarditis es la inflamación en el endocardio del tejido fundamentalmente valvular y más comúnmente a nivel de la válvula mitral. Esta puede ocurrir por: lesión endocárdica previa, enfermedad reumática, cardiopatías isquémicas o prótesis valvulares. En 43 % de los casos, esto representa que 1 de cada 1000 casos están asociados a infecciones bucales por bacteriemia, como puede ocurrir en la enfermedad periodontal durante el sondaje, la tartrectomía, los tratamientos quirúrgicos, entre otras maniobras.⁵⁰

Por otra parte, una placa de ateroma contiene todos los patógenos periodontales reconocidos que además intervienen en su formación.

Cabe agregar que la Food and Drug Administración de Estados Unidos de Norteamérica creó el Periostat®, el Atridox® y el Periochip®, medicamentos periodontales con doxiciclina, los cuales son administrados a estos pacientes, pues en las endocarditis están presentes muchos patógenos periodontales, entre los que figuran: *Streptococcus spp viridans* y *aureus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens* y ocasionalmente, *Capnocytophaga chracea*, así como los lactobacilos.⁵⁰

2.2.8.5.4 Neumonías por aspiración

Las neumonías por aspiración constituyen 18 de cada 100 y dos terceras partes de ellas ocurren en ancianos e inmunodeprimidos; asociadas a patógenos periodontales como: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Prevotella* y *Streptococcus*.

La aspiración de bacterias ocurre fundamentalmente en el área orofaríngea, cuando bacterias gramnegativas de las bolsas periodontales, así como otros patógenos respiratorios penetran y se extienden por el tracto respiratorio bajo hasta llegar al pulmón. Además, la colonización bacteriana que va directamente a la pared vascular por enzimas salivales hidrolíticas, las cuales favorecen la adhesión y colonización, propician la formación de la placa dental bacteriana y alteran las superficies mucosas.

Por otro lado, en el endotelio vascular, las bacterias alteran la hemostasia endotelial que tiende a un estado protrombótico y proaterogénico.⁵⁰

2.2.9 Microflora bucal periodonto patógena

2.2.9.1 .- Porphyromonas gingivalis

Los microorganismos con mayor presencia en el Biofilm dental subgingival, por ello más relacionadas con las patologías periodontales.⁵¹

En la periodontitis crónica, de todos los microorganismos aislados de esta lesión, el predominante es la *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), un gram

negativo, anaerobio estricto que aprovecha las condiciones que da el huésped para generar mayor daño.⁵²

2.2.9.1.1 Taxonomía

Del género bacteroides se identificó un grupo homogéneo de especies, llamados porphyromona. Estas especies presentaban la característica de ser no fermentadores, utilizar como sustrato el nitrógeno y obtener su energía a partir de tripticasa y peptona.⁵³

2.2.9.1.2 Morfología y estructura

P. gingivalis es un bacilo corto o cocobacilo, que mide de 0.5 - 0.8 μm x 1 - 3.5 μm ⁵³ anaerobio estricto, gram negativo, siendo considerado un comensal en la cavidad oral. Su pared celular presenta a nivel de la membrana externa las endotoxinas, son capsulados, no esporulados, sin flagelos y abundantes fimbrias de diferentes tipos.⁵⁴

2.2.9.1.3 Factores de virulencia

Cápsula: constituido por polisacáridos.⁵⁵

Lipopolisacárido

El LPS de *P. gingivalis* contiene 3 componentes: polisacáridos (exterior), oligosacáridos (centro) y lípido A (interior), siendo esta última la porción inmunogénica más activa. Durante la enfermedad, *P. gingivalis* libera vesículas que contienen LPS, las que pueden invadir los tejidos periodontales y activar la producción de citoquinas en macrófagos, fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales, pudiendo eventualmente ser reconocidas por las células presentadoras de antígenos (APCs) con la capacidad de presentar sus antígenos a los linfocitos T y desencadenar una respuesta inmune específica en el hospedero. En efecto, fibroblastos gingivales humanos estimulados *in vitro* con LPS de *P. gingivalis* durante 48 horas expresan niveles incrementados, a nivel proteico y de mRNA, de IL-6 e IL-8.⁵⁶

Polisacáridos Capsulares

Existen macromoléculas en la superficie de las bacterias que confieren estabilidad estructural y que cumplen un rol importante en el reconocimiento e interacción con el hospedero. En bacterias patógenas, las macromoléculas de superficie también forman una barrera defensiva que le permiten evadir respuesta inmune. En este contexto, los polisacáridos capsulares cumplen un rol importante en la mantención de la integridad de la célula en ambientes con alta presión inmune.⁵⁶

La cápsula de *P. gingivalis* se compone principalmente de glucosa, glucosamina, galactosa, 2-acetamido-2-deoxy-D-glucosa, galactosamina y los ácidos galactosaminurónico, manurónico, glucorónico y galacturónico, y sobre la base de su inmunogenicidad se han descrito 6 serotipos capsulares (K) diferentes, denominados K1, K2, K3, K4, K5 y K6.⁵⁶

Endotoxina (LPS): Presenta en la membrana externa de la bacteria, compuesta en parte por el lípido A, que estaría participando en la interrupción de la homeostasis inmunológica del huésped, ocasiona inflamación gingival, asociada con la destrucción del tejido conectivo y la reabsorción del hueso alveolar.⁵⁵

Vesículas de membrana externa: Son sacos cerrados que se encuentran a un nivel más externo de la bacteria, presentan en su interior numerosas enzimas como; fosfolípasa C, proteasas, fosfatasa alcalina, hemolisinas, lipopolisacaridos.⁵⁵

Hemaglutininas: Son proteínas codificadas por el gen *hag* y estas pueden ser 5 de A-E, promueven la colonización.⁵⁵

Fimbrias: Presentes en forma períttrica de 0.3 a 3.0 μ m de largo y 5 nm de ancho, compuestos por monómeros de fimbrilina, codificados por el gen *fimA*,

pudiéndose clasificar en 6 variantes, del tipo I al V y el Ib.³⁵ En pacientes afectados con periodontitis crónica, los genotipos de *P. gingivalis* más frecuentemente detectados son el tipo II y IV, mientras que en adultos sanos el genotipo más prevalente es el tipo I, lo que implicaría una especificidad genotípica asociada al gen *fimA* entre salud y enfermedad periodontal.⁵⁶

La asociación entre presencia y severidad de las lesiones periodontales con el genotipo *fimA* detectado en ellas podría deberse a una variable patogenicidad bacteriana. En efecto, el genotipo *fimA* II es capaz de inhibir a los receptores que inducen la fagocitosis en macrófagos, además de inducir mayores niveles de expresión de RANKL, asociándose la mayor prevalencia de este genotipo con una mayor destrucción ósea alveolar y una mayor profundidad de las lesiones periodontales en pacientes afectados de periodontitis crónica.⁵⁶

Enzimas Proteolíticas

Las *gingipaínas* son un grupo de proteasas producidas por *P. gingivalis* pertenecientes al grupo de *trypsin-like cystein proteinases*. Las *gingipaínas* *RgpA* y *RgpB* son codificadas por los genes *rgpA* y *rgpB*, respectivamente, y son específicas para péptidos ricos en arginina (Arg- Xaa). Por otro lado, la *gingipaína* *Kgp* está codificada por el gen *kgp* y es específica para péptidos ricos en lisina (Lys-Xaa)(34). *RgpA* y *Kgp* son complejos que contienen dominios de separación catalítica y de adhesión hemaglutinínico; mientras que *RgpB* sólo presenta un dominio de catálisis. *RgpB* determina el desarrollo del edema mediante la activación de la vía kalikreína/quinina y la infiltración por neutrófilos mediada por la activación de los factores quimiotácticos del complemento. En cambio, *Kgp* y *RgpA* controlan el sangrado gingival a través de la degradación del fibrinógeno/fibrina.

RgpA y *RgpB* son capaces de inactivar citoquinas y sus receptores, estimular la agregación plaquetaria, atenuar la actividad antibacteriana de los neutrófilos por medio de la inhibición del receptor de LPS, incrementar la permeabilidad vascular y la apoptosis de los queratinocitos gingivales y destruir

macrófagos CD14+. Kgp es capaz de promover la adhesión e invasión bacteriana *in vitro*. En el fluido gingival crevicular de pacientes con periodontitis crónica RgpA y RgpB se asocian al aumento de los neutrófilos en los sitios periodontales infectados y Kgp, RgpA y RgpB al sangrado gingival.⁵⁶

Proteínasas cisteinproteasas: Son compuestos bacterianos que proporcionan nutrientes para el crecimiento bacteriano, produciendo un daño colateral al huésped, degradando colágeno de diferentes tipos.⁵⁷

Proteínasas no cisteinproteasas: Estas son la collagenasa, proteasa, hemaglutinina, una enzima tipo convertora de endotelina, una dipeptidilpeptidasa y la periodontaina.⁵⁷

2.2.9.1.4 Fisiopatología

P. gingivalis es considerado un colonizador secundario, comensal del surco gingival, que llega por contagio o transmisión por individuos infectados, por medio de la saliva principalmente.⁵⁸ Su capacidad de adherirse principalmente por sus fimbrias peritricas tipo Ib, II así como por sus vesículas de membrana, hemaglutininas, cápsula, le permiten dar el primer paso en la colonización del surco, poder adaptarse e invadir las células epiteliales en un periodo aproximado de 20 minutos, pudiendo replicarse dentro de ellas y diseminarse a las células de alrededor.⁵⁸

2.2.9.1.5 Presencia de *Porphyromona gingivalis* en enfermedades sistémicas

Una variedad de estudios abordan la asociación entre Pg y PCR como factores de riesgo para distintas enfermedades sistémicas inflamatorias: enfermedad cardiovascular, diabetes, enfermedad renal, artritis reumatoide, preeclampsia y resultados adversos en el embarazo.

Porphyromona gingivalis está asociada con incremento en los niveles de proteína-C Reactiva, indicando que la infección periodontal puede contribuir al aumento.⁵⁹

La infección periodontal medida por los niveles de anticuerpos a *P. gingivalis* y PCR es un fuerte predictor de enfermedades cardiovasculares. La periodontitis y su progreso están asociados con cambios en los componentes séricos de PCR, consistentes con una respuesta de fase aguda.

No se ha encontrado asociación de *A. actinomycetemcomitans* y de *P. Intermedius*, con niveles elevados de PCR. Los estudios realizados en pacientes diabéticos tipo 2 con periodontitis crónica han encontrado asociación entre Pg y PCR con enfermedad vascular aterosclerótica.⁵⁹

Es fundamental la infección con Pg y su asociación con anticuerpos relacionados con artritis reumatoide y PCR, en el riesgo y progreso de la AR. Se ha documentado que Pg es el microorganismo más prevalente en mujeres con preeclampsia, presentándose correlación con PCR.⁵⁹

La presencia de Pg en el líquido amniótico puede indicar una función periodontopatogénica en mujeres embarazadas con diagnóstico de amenaza de parto prematuro.⁵⁹

ESTUDIOS QUE RELACIONAN LA PORPHYROMONA GINGIVALIS Y LA PROTEÍNA C REACTIVA CON ENFERMEDADES SISTÉMICAS INFLAMATORIAS			
Estado sistémico	Tamaño de la muestra	Autor	Año
Saludable	121	Pitiphat (2)	2008
Infarto de miocardio	1.173	Lund Haheim (26)	2008
Enfermedad cardiovasculares	505	Pussinen (27)	2007
Enfermedad cardiovasculares	174	Noack (28)	2001
Enfermedad cardiovasculares	2.973	Dye (29)	2005
Respuesta de fase aguda	185	Craig (22)	2003
Hipertensión	1.314	Furuichi (30)	2003
Síndrome coronario agudo	322	Renvert (32)	2006
Diabetes tipo 2	132	Nishimura (34)	2002
Diabetes tipo 2	134	Taniguchi (35)	2003
Diabetes tipo 2	134	Kuroe (36)	2004
Artritis reumatoide	157	Mikuls (17)	2009
Preeclampsia	398	Herrera (18)	2007
Amenaza parto prematuro	26	León (38)	2007

2.2.9.1.6 Aislamiento in vitro

Puede ser sembrado en medios enriquecidos como Agar sangre suplementado o el medio selectivo Agar Columbia antibiótico e incubar a 37 °C por 7 a 14 días, en condiciones de anaerobiosis, que puede ser por Jarra, cámara o sobres de anaerobiosis.⁶⁰

Pasado el tiempo, la lectura de las colonias debe reconocer características como; tamaño de 1-2 mm, forma redonda, convexa y ser pigmentados de un color marrón a negro. La coloración gram debe evidenciar una morfología cocobacilar de 0.5x1-2 um y ser negativa.⁶⁰

2.2.9.1.7 Relación con la periodontitis crónica

Una de las patologías más comunes en la cavidad oral es la periodontitis crónica, la cual presenta una etiología bacteriana predominante, siendo entre ellas, las que más destacan *P. gingivalis*, *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, que son considerados como el grupo agresivo en la lesión. Pero es la *P. gingivalis* la predominante en esta patología.⁶¹

2.2.9.1.8 Tratamiento mecánico y antimicrobiano

Se basa en la remoción del Biofilm subgingival, por medio de la fase I del tratamiento periodontal, recomendando la remoción en una sola cita.

A su vez se indica la mejora de la fisioterapia del paciente, a un nivel de control del índice de higiene oral a 20 %. Otro elemento que puede ayudar a mejorar el tratamiento es el uso de antimicrobianos, ya sea locales como la clorhexidina al 0.12 % aplicado 2 veces por día por un periodo de 10 a 14 días, sistémicos como la amoxicilina de 500 mg y Ácido clavulánico de 125 mg x 7 días, amoxicilina de 500 mg y metronidazol de 500 mg por 5-7 días, fluoroquinolonas como la moxifloxacin en dosis de 400 mg x día y la azitromicina de 500 mg por día, en 3 días consecutivos vía oral.⁶²

2.2.9.2 .-Fusobacterium nucleatum

En la periodontitis por lo general no se presenta una bacteria en particular, sino que son varias las que participan en el proceso destructivo del periodonto. *F. nucleatum* es una de las especies más comunes en infecciones humanas.⁶³

2.2.9.2.1 Taxonomía

El género *Fusobacterium* pertenece a la familia *Bacteroidaceae*, que incluye bacilos gram negativos, anaerobios obligatorios, no formadores de esporas, pleomórficos e inmóviles, naturalmente encontrados como especies dominantes en la microbiota de seres humanos y animales. En los seres humanos son comúnmente aislados de la microbiota normal de la cavidad oral (surco gingival y placa bacteriana), tracto respiratorio superior, gastrointestinal y genitourinario femenino. Posee 5 subespecies: *nucleatum*, *polumorphum*, *vincentii*, *fusiforme* y *animalis*. La producción de ácido butírico como principal producto de fermentación de glucosa y peptona, junto con las características de

los constituyentes lipídicos, diferencias las especies *Fusobacterium* de otros bacilos anaerobios gram negativos, no formadores de esporas.⁶⁴

2.2.9.2.2 Morfología y estructura

El *Fusobacterium nucleatum* se presenta como bacilo gram negativo, largo y delgado de 3 a 10µm y 0,4 a 0,7µm, respectivamente, con extremos puntiagudos-fusiformes, agrupados en pares y pueden presentar gránulos intracelularmente. Se tiñen de forma irregular, pueden encontrarse formas cocoides y filamentosas. Sin embargo, la morfología de su colonia no es un parámetro consistente y no es suficiente para la identificación de la especie. *Fusobacterium nucleatum* no presenta actividad sialidasa, y es considerado heterogéneo.⁶³

2.2.9.2.3 Factores de virulencia

Lipopolisacárido

Las bacterias *Gram* negativas se caracterizan por tener en la membrana plasmática exterior una bicapa asimétrica de lipoproteínas: la capa interna compuesta principalmente de fosfolípidos y la externa de LPS, fosfolípidos y proteínas. Cerca de un tercio de la masa de la membrana externa de *Fusobacterium* es proteína, y eso determina un perfil proteico característico en electroforesis con gel de poliacrilamida.⁶⁴

Endotoxina (LPS): Es una toxina que tiene actividad biológica comparable con los LPS de ciertos tipos de *E.coli* que causa reabsorción ósea, activando macrófagos para que estimulados produzcan interleuquina IL1-B, interleuquina IL6 y factor alfa de necrosis tisular, mediadores de la inflamación y reabsorción ósea.⁶³

Expresión sinérgica de virulencia

Muchos genes de virulencia en bacterias de la placa son solo expresadas cuando especies bacterianas entran en contacto con el huésped o con otra bacteria compañera comunitaria, las propiedades de virulencia de la *P.gingivalis* son incrementadas al interactuar con *F.nucleatum*.⁶³

Producción de metabolitos

Butirato, propionato e iones de amonio inhiben la proliferación de fibroblastos gingivales. Esto es serio ya que el potencial para una curación rápida de la lesión está comprometido.⁶³

2.2.9.2.4 Fisiopatología

El potencial patogénico de *Fusobacterium nucleatum* y su significancia en el desarrollo de enfermedades periodontales, así como en infecciones en otros órganos, ha ganado nuevo interés por varias razones. Primero, esta bacteria tienen el potencial de ser patogénica debido a su número y frecuencia en lesiones periodontales, su producción de irritantes tisulares, su sinergismo con otras bacterias en infecciones mixtas y su habilidad para formar agregados con otros patógenos sospechosos en enfermedad periodontal y además, actúa como puente entre los colonizadores tempranos y tardíos de la superficie dental.⁶⁵

En segundo lugar, de las especies microbianas que son estadísticamente asociadas con la enfermedad periodontal, *F.nucleatum* es la más común en infecciones clínicas de otras partes del cuerpo. En tercer lugar, durante los últimos años, clonación, secuenciación y la aplicación de nuevas técnicas como PCR hicieron posible obtener más información acerca de *F.nucleatum* en su nivel genético, por lo tanto, ganando así mejor entendimiento de la estructura y funciones de sus proteínas de membrana externa. Estas proteínas son de gran interés en lo que respecta a la coagregación, nutrición celular y susceptibilidad antibiótica. Muchos estudios

han mostrado que estas proteínas están involucradas en la patogenicidad de las bacterias gram negativas.⁶⁶

2.2.9.2.5 Enfermedad periodontal y *Fusobacterium nucleatum*

Dentro de las especies más prevalentes y predominantes en la enfermedad periodontal del adulto, encontramos al *Fusobacterium nucleatum*. Éste ha sido aislado tanto de sitios de enfermedad periodontal activos como inactivos, lo que sugiere que diferentes subgrupos podrían variar en su patogenicidad y estar relacionados a diferentes grados de actividad de la enfermedad periodontal. Las subespecies más comunes en el surco gingival es *F.nucleatum* sub, *vicentii* y *F.nucleatum* sub.*nucleatum*.⁶³

La capacidad de *F.nucleatum* para formar polímeros intracelulares desde glucosa, galactosa y fructosa bajo condiciones de exceso de aminoácido y de fermentar esta reserva de azúcar bajo condiciones de privación de aminoácido puede contribuir a la sobrevivencia de *F.nucleatum* en el ecosistema de la cavidad oral y en la persistencia de este organismos en la enfermedad periodontal.

El *Fusobacterium nucleatum* es conocido por tener el potencial de un patógeno periodontal. Una característica es la producción de metabolitos tóxicos.

En infecciones experimentales inducidas en ratas, muestras de *F.nucleatum* fueron patogénicas al ser administradas en cultivo puro, sin embargo, un cultivo mixto de *F.nucleatum* y *P.gingivalis* o con *Prevotella intermedia*, fue significativamente más patogénico que el *F.nucleatum* en cultivo puro. El encuentro más importante fue el efecto ejercido por *F.nucleatum* en la colonización de *P.intermedia*, esta nunca fue detectada en un sitio en el que el *F.nucleatum* no estuviese presente.⁶⁴

2.2.9.2.6 Relación *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromona gingivalis*

La *Porphyromona gingivalis* y el *Fusobacterium nucleatum* pertenecen al grupo de las bacterias anaeróbicas estrictas asociadas con enfermedad periodontal. Debido a sus numerosos factores de virulencia, el *P.gingivalis* es considerado una de las principales bacterias periodontopatógenas. *F.nucleatum* es también referido como un organismo clave para la maduración de la placa dental debido a su extensa capacidad de agregación. El *F.nucleatum* parece ser un puente o mediador de la coagregación entre especies anaerobias obligadas y facultativas. Se sugirió que esta coagregación era el mecanismo por el cual bacterias anaerobias estrictas como la *Porphyromona gingivalis* sobreviven bajo condiciones aeróbicas, debido a la formación de micro ecosistemas. En el estudio realizado por Diaz et al.⁶⁷, adicionaron al conocimiento del potencial directo de intervención del *F.nucleatum* en el proceso de la enfermedad, que éste también podría tener un importante rol indirecto en la etiología de la enfermedad periodontal al apoyar el crecimiento de *P.gingivalis* y posiblemente otros anaerobios orales en ecosistemas oxigenados y agotados de CO₂.⁶⁷

La protección contra los efectos deletéreos del oxígeno puede ser importante en etapas tempranas del desarrollo de la placa y en bolsas periodontales, donde los microorganismos tienen que enfrentar la presencia de niveles residuales de oxígeno.

Desde un punto de vista ecológico, la identificación de microorganismos que, como el *F.nucleatum*, apoyan el crecimiento de otros periodontopatógenos es importante ya que el control de esas especies podría alterar radicalmente el ecosistema patogénico.⁶⁷

2.2.9.2.7 Relación con enfermedades sistémicas

Los microorganismos del género *Fusobacterium* producen infecciones polimicrobianas de origen endógeno que aparecen cuando en el hospedero

existen factores predisponentes como: traumas, instrumentación, manipulación, infecciones orales, disminución del potencial de O₂ y necrosis del tejido.

Las fusobacterias pueden originar amigdalitis crónicas. El *Fusobacterium nucleatum* está asociado a infecciones pleuropulmonares como la neumonía aspirativa, el absceso de pulmón y el empiema. Este microorganismo, en conjunto con *Bacteroides ureolyticus*, son los agentes anaerobios más frecuentes en mujeres con infección del líquido amniótico y membranas intactas.

Las fusobacterias asociadas a espiroquetas anaerobias producen un gingivitis ulcerativa necrosante aguda (GUNA), un tipo de gingivitis poco común que se observa en adultos jóvenes sometidos al estrés.⁶⁸

Las especies de *Fusobacterium* pueden causar sinusitis aguda precedida de una infección dental, así como sinusitis crónica. La infección a nivel de piel y tejidos blandos se desarrolla cuando el tejido está traumatizado o desvitalizado por heridas traumáticas o por isquemia de las extremidades asociadas con arterioesclerosis o diabetes mellitus.

Las fusobacterias pueden ocasionar infecciones polimicrobianas intraabdominales tales como abscesos de hígado y bazo. En estudios recientes se ha reportado un incremento de su incidencia en endocarditis.

En ocasiones, las especies de *Fusobacterium* pueden causar infecciones como osteomielitis, se ha hallado en cultivos puros y de forma unimicrobiana.⁶⁸

2.2.9.2.8 Aislamiento in vitro

El *F.nucleatum* es una típica bacteria que puede crecer en medios enriquecidos como Agar sangre suplementado con hemina, Vitamina K y extracto de levadura, en agar sangre con vancomicina, la infusión cerebro corazón suplementada con extracto de levadura, agar brucella y agar Columbia, suplementados con vitamina K y hemina. Para su crecimiento se

requiere incubarlo a condiciones de anaerobiosis por 5-7 días a 37°C, a pH 7. Son catalasa negativa; no reducen NO₃ a NO₂; no producen ureasas.⁶⁸

2.2.9.2.9 Tratamiento antimicrobiano para *F.nucleatum*

Las fusobacterias son sensibles a la penicilina G, que se utilizan como droga de elección, y como drogas alternativas secundarias se emplean clindamicina y cloranfenicol.⁶⁸

Antes que todo uso de medicación, se indica llevar a cabo la fase I de la terapia periodontal, instruyendo al paciente en el control de placa y de una reevaluación periódica de su caso.

En la terapia antimicrobiana local se recomienda clorhexidina.⁶³

2.3 Planteamiento del problema

La práctica medicinal con plantas, ha sido utilizada desde tiempos muy antiguos dándoles a ellas una propiedad importante para su uso¹. Las plantas le han dado un rol fundamental como medio para curar enfermedades en la población tradicional la cual es aproximadamente el 85 %, la cual está incluida la población andina y amazónica de nuestro país.

Dentro de los estudios realizados con plantas medicinales en el campo de la odontología, existen pocos para conocer las propiedades antimicrobianas sobre cepas periodonto patógenas¹, más existen sobre las cepas cariogénicas que son las que originan la afección bucal que más prevalencia e incidencia en el Perú posee, sin embargo, las enfermedades del periodonto son las segundas y se encuentran más relegadas.

El presente estudio se refiere a la evaluación del efecto antimicrobiano de la óleo-resina de *Copaifera officinalis*, que se encuentra en la amazonía del Perú y de Brasil, sobre principales bacterias periodontopatógenas de la cavidad bucal. Se busca evaluar qué tanto efecto posee a diferentes concentraciones en comparación con el digluconato de clorhexidina al 0.12% de manera que pueda extenderse su uso en conjunto o sustituyendo a la clorhexidina evitando así sus efectos adversos de un uso prolongado de este para la prevención, tratamiento y control de la enfermedad periodontal.

2.4 Formulación del problema

¿Cuál es el efecto antimicrobiano in vitro de la óleo-resina de *Copaifera officinalis* sobre las principales cepas bacterianas periodontopatógenas de la cavidad bucal?

Definición de términos:

- **Fitoterapia:** es un neologismo empleado por Henri Leclerc, médico francés (1870-1955), en los comienzos de siglo, desde entonces la palabra fitoterapia es utilizada para designar la utilización de las plantas medicinales con fines terapéuticos, que serviría más tarde para diferenciarla de la forma de curar actual; la medicina sintética o convencional. En 1980 ya contaba con una definición más acabada: *“terapia complementaria que utiliza plantas o partes de ellas donde el empirismo de la medicina tradicional se transforma en fundamento científico”*, en otras palabras a la medicina tradicional o autóctona se la pone a prueba en laboratorios siguiendo el método científico para validar o descartar el uso popular.⁶⁹

- **CIM:** Concentración inhibitoria mínima, Es la concentración del antibiótico requerida para impedir el crecimiento bacteriano a partir de la incubación de 10^{5-6} bacterias en fase de crecimiento rápido, en un medio libre de proteínas con pH 7,2, aerobio, durante un periodo de incubación de una noche.

Este término es importante porque se utiliza para determinar la sensibilidad bacteriana a un agente antibiótico específico. Es importante recordar que las condiciones in vivo son distintas a las utilizadas para esta prueba que se realiza in vitro.

- **CBM:** concentración bactericida mínima, Se refiere a la concentración al agente antibiótico necesaria para producir una disminución del tamaño original del inóculo bacteriano en un porcentaje mayor o igual al 99.9%. Muchas veces la CIM es equivalente al MBC.

Nota: Es importante diferenciar entre efecto bactericida y bacteriostático, el primero produce una disminución en el número bacteriano, mientras el segundo impide su crecimiento sin afectar por sí solo su número inicial

2.5 Justificación

La salud oral representa un problema de salud pública en nuestro país, debido a la alta incidencia y prevalencia de caries dental y enfermedad periodontal en la población peruana, influyen los costos relacionados con su tratamiento y la posibilidad de aplicar medidas eficaces de prevención para el cuidado y mantenimiento de la salud bucal. Dada la necesidad de recursos de menor costo para atender a las comunidades más carentes, la fitoterapia surge como una alternativa en especial de la población más necesitada.

La odontología en nuestro país, está en búsqueda de nuevos productos con mayor efectividad farmacológica, con menor toxicidad y más biocompatibles, además de que presenten costos más accesibles a la población. La fitoterapia tiene buena aceptación en el mercado de productos odontológicos que contienen sustancias naturales, pues estos son introducidos desde que son avalados por estudios de laboratorio y clínicos específicos.¹

El presente estudio evaluará la actividad antimicrobiana de la *Copaífera officinalis* sobre bacterias periodontopatógenas, ocupando la enfermedad periodontal el segundo lugar de las afecciones bucales con mayor prevalencia e incidencia en nuestro medio, además se haya en la población vulnerable como son los niños y adolescentes. Esto servirá para limitar el avance de la enfermedad en la población más joven que puede desarrollar enfermedades periodontales más avanzadas en poblaciones adultas.⁴

2.6 .-Limitaciones

■ Dada la naturaleza del presente estudio, experimental in vitro, los microorganismos se desarrollaron en condiciones ambientales simuladas en el laboratorio utilizando los parámetros necesarios para su desarrollo ideal; a diferencia de los demás factores que pueden influir en las condiciones in vivo.

- Las bacterias empleadas son muy exigentes en su crecimiento y tiempo de vida en medio aerobio, que pudo afectar la magnitud de su desarrollo durante el experimento.

- Debido a tener el experimento por duplicado por su complejidad y alto costo, no se realizaron un número “n” de repeticiones que permitieran emplear cálculos estadísticos con los resultados obtenidos, sólo descripción del resultado obtenido.

2.7 .- Objetivos del estudio

2.7.1 General

- Determinar el efecto antimicrobiano de la óleo-resina de *Copaifera officinalis* sobre las principales cepas bacterianas periodontopatógenas (ATCC) *Porphyromona gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* a diversas concentraciones.

2.7.2 Específicos

- Identificar el efecto antimicrobiano mediante la CIM de la óleo-resina de *Copaifera officinalis* sobre las principales cepas bacterianas periodontopatógenas (ATCC) de *Porphyromona gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*.

- Valorar el efecto antimicrobiano de *Copaifera officinalis* en comparación al digluconato de clorhexidina sobre las principales cepas bacterianas periodontopatógenas (ATCC) de *Porphyromona gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*.

- Comparar el efecto antimicrobiano producido por la óleo-resina de *Copaifera officinalis* sobre *Porphyromona gingivalis* y el *Fusobacterium nucleatum*

2.8 .-Hipótesis

Existe actividad antimicrobiana de la óleo-resina de *Copaifera officinalis* sobre las cepas periodontopatógenas orales de *Porphyromona gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*.

III. Metodología

3.1.-Tipo de estudio

Experimental

Prospectivo

Transversal

In vitro

3.2.-Población y muestra

Población: se trabajó con cepas estándares de ATCC.

Muestra: *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 y *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 procedentes del American Culture Collection (ATCC) y la óleo-resina de *Copaifera officinalis* a diferentes concentraciones: 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%, 1.56%, 0.78%, 0.39%, 0.19%.

3.3 .-Operacionalización de variables

Variable independiente

Cepas de *Porphyromona gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*

Variable dependiente

Acción antimicrobiana de la óleo-resina de *Copaifera officinalis*

Variable control

Control negativo: Tween 80

Control positivo: Clorhexidina 0.12% (bacterias periodontopatógenas)

Variable	Descripción	Indicador	Unidad de medida	Fuente
Óleo-resina	Obtenida de extracción de árbol de <i>Copaifera officinalis</i>	Cantidad volumétrica	mL	Especímenes de Copafeira officinalis
Cepas periodonto patógenas	Microorganismos presentes en la cavidad oral	Crecimiento en medio de cultivo	10uL	Cultivos estandarizados ATCC
Acción antimicrobiana	Efecto del producto en estudio sobre los microorganismos	Inhibición de crecimiento	Presencia o ausencia	Cultivo bacteriano

3.4 Materiales

Materiales y Equipos de laboratorio

- Refrigeradora marca COLDEX 15 pulgadas
- Balón de fondo plano marca PYREX
- Beaker
- Estufa esterilizadora marca Memmert 20 °C a 250 °C
- Papel filtro Wattman N° 20

Materiales y equipos para la preparación de medios de Cultivo

- Agua destilada
- Probetas
- Pipetas
- Matraces marca PYREX

- Autoclave vertical de 100 litros de capacidad
- Refrigeradora marca COLDEX 15 pulgadas
- Placas petri
- Tubos de ensayo
- Agar Schaedler
- Sangre de cordero

Materiales y Equipos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana

- Cloruro de sodio al 0,9 %
- Pinzas estériles
- Asa de Kolle
- Placas petri de 150mmx15mm
- Medios de cultivo
- Cepas de las bacterias
- Mechero Bunsen
- Sacabocado de 11mm
- Óleo-resina de *Copaifera officinalis* a diferentes concentraciones
- Control positivo: Clorhexidina
- Control negativo: Tween 80, agar puro
- Micropipeta
- Escala de Mc Farland

Infraestructura

- Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la U.N.M.S.M.
- Laboratorio del Centro del control analítico de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N.M.S.M

Presupuesto y financiación

- Obtención de financiación por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.5.- Métodos

3.5.1 Procedimientos y Técnicas

3.5.1.1 Obtención

La obtención de la oleo-resina de copaiba fue por incisiones profundas del árbol de *Copaifera officinalis*, obteniéndose un aceite resinoso, que se guardó para su posterior uso en un recipiente hermético bajo refrigeración y protegido de la luz.

3.5.1.2 Determinación de la concentración

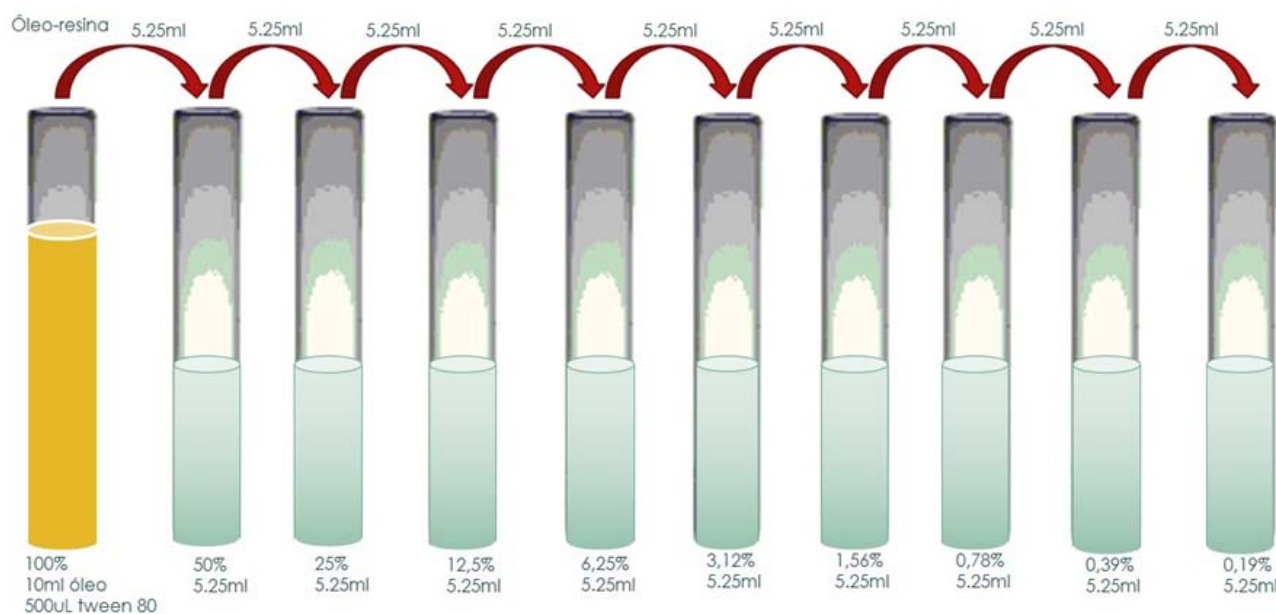
Se empleó la escala de porcentajes de concentración del antimicrobiano estipulada en el método de dilución en caldo, la cual es una prueba de sensibilidad. Es un método cuantitativo considerado de referencia, que permite determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM).⁷⁰ En el presente estudio se empleó la técnica de dilución en agar, este método es igual al de dilución en caldo, con la diferencia de que se trabaja en cajas con medios sólidos que contienen concentraciones decrecientes del antimicrobiano selectivo, en esta oportunidad, del óleo-resina de *Copaifera officinalis*. Los microorganismos se desarrollan en aquellas placas que no contengan una cantidad de antimicrobiano suficientes como para inhibirlos, con este método es posible determinar la CIM pero no la CBM, la cual no se encuentra dentro de los objetivos específicos del presente estudio.

Se empleó la técnica de dilución en agar pues es la estipulada por el Clinical and Laboratory Institute (CLSI) para todas las bacterias anaerobias.⁸ Este método permite una interpretación y lectura de resultados más simple en comparación con la técnica de dilución en caldo.⁷⁰

3.5.1.2.1 Preparación de las soluciones de *Copaifera officinalis*

Para posibilitar la solubilización de la óleo-resina de *Copaifera officinalis*, se utilizó el agente tween 80 que es un surfactante hidrofílico. Se utiliza para la emulsificación de aceite en agua (O/W), dispersión o solubilización de aceites, y para hacer lavables las pomadas anhidras.

La concentración a utilizar del tween 80 en todas las soluciones será de máximo 5 ug/ml de la concentración final del medio de cultivo.⁸



3.5.1.3 Preparación del material biológico

Las cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 y *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 fueron importadas.

-Reactivación de las Cepas bacterianas por el método de recuperación en placa donde se trabajó con cepas estándares ATCC (American Type Culture Collection) según las condiciones descritas en la tabla 1.

-Preparación de los medios de cultivo de acuerdo al tipo de microorganismo.

Tabla N° 1.- Cultivo de cepas bacterianas ATCC

Microorganismo	Medio de cultivo	Temperatura	Tiempo	Incubación
Porphyromona gingivalis	Agar Schaedler con 5% sangre de cordero	37°	5 días	Anaerobiosis
Fusobacterium nucleatum	Agar Schaedler con 5% sangre de cordero	37°	5 días	Anaerobiosis

3.5.1.3.1 Procedimiento:

La cepa de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 y de *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 fueron retiradas del vial que las contenía y se sembraron asépticamente con un asa de siembra en placas petri conteniendo agar schaedler con 5% de sangre de cordero.

El sembrado de las cepas se realizó usando un mechero Bunsen el cual brinda un halo de esterilización para evitar la contaminación de la placa de Petri conteniendo el agar. Luego se incubaron las placas por cinco días a 37 °C en anaerobiosis.

Una vez reactivadas las cepas, se cosecharon con un asa bacteriológica estéril y se diluyeron para obtener una suspensión en un tubo de ensayo con caldo BHI hasta obtener una dilución de 0,5 en la escala turbidimétrica de Mc Farland que es equivalente a 10^8 UFC/mL. Luego, se realizó una dilución 1:10 para obtener una concentración de 10^7 UFC/mL.

3.5.1.4 Procedimiento para la dilución en agar

La dilución en agar es un método bien establecido para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos. El agente antimicrobiano, solución de óleo-resina de *Copaifera officinalis*, se incorpora dentro del medio con agar, de manera tal que cada placa contenga una concentración del agente antimicrobiano diferente. Los inóculos de los distintos microorganismos se pueden aplicar rápida y simultáneamente sobre la superficie del agar utilizando un replicador de Stern. La mayoría de los replicadores existentes transfieren de 32 a 36 inóculos a la vez por cada placa.⁷¹ En el presente estudio se usó una micropipeta.

3.5.1.5 Materiales y reactivos

Agar Schaedler

El agar Mueller Hinton demostró ser, de todos los medios disponibles, el mejor para las pruebas de sensibilidad de rutina de bacterias no exquisitas en sus exigencias para su crecimiento, sin embargo, en el presente estudio, las bacterias anaeróbicas empleadas son exigentes y exquisitas en sus requerimientos de crecimiento, motivo por el cual, es válido reemplazar el agar Mueller Hinton por aquel que les provea todo lo necesario para su crecimiento.⁷⁰

El agar Schaedler es un medio de cultivo preparado en placa de Petri adicionado de sangre de cordero. Este medio es altamente nutritivo y fue diseñado especialmente para soportar el crecimiento de microorganismos anaerobios de difícil crecimiento tales como lactobacillus, streptococcus, clostridium y bacteroides, la combinación de hidrolizado enzimático de caseína, proteasa peptona, digerido papainico de proteína de soya, extracto de levaduras y L-cistina proveen el nitrógeno, factores de crecimiento, vitaminas y otros factores esenciales para el crecimiento. La dextrosa se utiliza como recurso energético, la hemina y la sangre de cordero estimulan el crecimiento

de microorganismos de difícil crecimiento como bacteroides y otros gram-positivos formadores de esporas.

El agar Schaedler se debe preparar a partir del polvo deshidratado según las recomendaciones del fabricante. Después de llevarlo a la autoclave a 121°C durante 15 minutos, el agar se debe enfriar y mantener en baño maría a 48-50°C antes de agregarle, en forma estéril, la solución del antimicrobiano y/o suplementos sensibles al calor, y finalmente colocar 20ml en cada placa. Se emplearán 26 placas Petri de 9cm de diámetro.

El pH del agar se debe controlar, en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UNMSM, se empleó una cinta de pH. El pH del agar MH debe estar entre 7,2 y 7,4 y a temperatura ambiente, por lo tanto se debe probar después de solidificado. La determinación del pH es muy importante porque a valores bajos algunas drogas pierden actividad y otras la incrementan. Si el pH es demasiado alto se observa el efecto opuesto.⁷¹

3.5.1.6 Preparación de las placas de agar

Procedimiento

- Se agrega la solución del antimicrobiano apropiada para cada dilución, en el agar fundido y enfriado a 48 - 50°C en baño maría.
- Se agita la mezcla agar-antimicrobiano y se coloca en la placa de petri hasta alcanzar una profundidad de 3-4 mm.
- La mezcla agar-antimicrobiano debe ser colocada rápidamente en las placas para evitar la solidificación total o parcial de la misma dentro del recipiente de mezclado.

Si las placas no se usan de inmediato, el medio agar Schaedler debe conservarse a T° de 4-8°C colocando las placas en posición invertida para evitar que el agua de condensación pueda caer sobre la superficie del medio.⁷¹

Esquema para la preparación de las diluciones

Se realizó la dilución de una parte de la solución de antimicrobiano en 9 partes del agar Schaedler fundido. Para placas circulares de 90 mm de diámetro son necesarios 20 ml de medio con antimicrobiano (habitualmente en la proporción 19 ml de medio por 1 ml de solución de la correspondiente concentración de antimicrobiano).⁷¹

Placas de control de crecimiento

El control de viabilidad de los microorganismos a los cuales se les evaluó la sensibilidad, se realizó inoculándolos sobre placas sin antimicrobiano. El agregado o no de suplementos depende de las necesidades nutricionales de la bacteria en estudio, en este caso, se empleó sangre de cordero 5%.

Placas de control positivo

Se prepararon dos placas conteniendo digluconato de clorhexidina al 0.12% como control positivo de la acción antimicrobiana.

Escala 0,5 Mc. Farland para el inóculo

Los estándares de turbidez de McFarland se usan como referencia en suspensiones bacteriológicas para saber que el número de bacterias por mililitro, o más bien en UFC según una escala que va de 0.5 a 10. Estos estándares son creados al mezclar soluciones de cloruro de bario al 1% con ácido sulfúrico al 1% en volúmenes específicos, para asegurar la densidad correcta se puede controlar usando espectofotómetros o fotocolorímetros.⁷²

Los estándares pueden ser visualmente comparados con suspensiones de bacterias en salina estéril o en caldos. Si la suspensión es demasiado turbia, puede añadirse diluyente, y si no es lo suficiente turbia, se puede agregar más bacterias. La ventaja es que no es necesario incubar ni usar equipo especial para estimar el número de bacterias.⁷²

Casos específicos en los que se usa es en el antibiogramas o pruebas de sensibilidad, donde es necesario para estandarizar el método y se eviten falsos positivos o negativos.

Para estandarizar la densidad del inóculo se usa una suspensión de sulfato de bario (0,5 de la escala de Mac Farland) como estándar.⁷²

3.5.1.7 Preparación del inóculo

El inóculo estandarizado para el método de dilución en agar, se puede preparar permitiendo el crecimiento del microorganismo hasta la turbidez 0,5 de la escala de McFarland o bien, en el presente estudio, re-suspendiendo colonias directamente hasta alcanzar dicha turbidez y realizando la comparación visual para alcanzar dicho punto.

Dilución de la suspensión bacteriana

El cultivo ajustado a la turbidez equivalente al patrón 0,5 de McFarland contiene, para la mayoría de las especies, aproximadamente 10^8 UFC/ml⁷⁰. El inóculo final requerido para la prueba de dilución en agar es de 10^4 unidades formadoras de colonias (UFC) por “spot” de 5 – 8 mm de diámetro. Por lo tanto se debe diluir la suspensión bacteriana, ajustada al 0,5 de McFarland, 1/10 en solución fisiológica obteniéndose de esta manera una concentración de 10^7 UFC/ml. Con ayuda de la micropipeta se aplican 10uL sobre la superficie del agar. Entonces el inóculo final absoluto sobre el agar es de alrededor de 10^4 UFC por “spot”. Una vez ajustado, el inóculo debe utilizarse dentro de los 15 minutos.⁷¹

3.5.1.8 Inoculación de las placas de agar

- 1) Los tubos que contienen la suspensión bacteriana ajustada y diluida (10^7 UFC/ml) se colocaron en una gradilla.
- 2) Se debe marcar cada placa de agar para conocer la ubicación de los inóculos en la misma.

- 3) Se aplicó una alícuota de 10 µL de cada inóculo sobre la superficie del agar, en cada pocillo, seis pocillos en cada placa, 3 para la *Porphyromona gingivalis* y 3 para el *Fusobacterium nucleatum*, por medio de la micropipeta.
- 4) Para comenzar se inoculó una placa control de agar sin antimicrobiano (control de viabilidad) y luego se inocularon las que contienen las distintas concentraciones del antimicrobiano comenzando por la de menor concentración.
- 5) Se inoculó con una micropipeta 10 uL de cada microorganismo a los seis pocillos hechos sobre la superficie del agar con clorhexidina al 0.12%.
- 6) Se inoculó con una micropipeta 10 uL de cada microorganismo a los seis pocillos hechos sobre la superficie del agar con Tween 80.

Incubación de las placas

- 1) Las placas inoculadas mantuvieron a temperatura ambiente hasta que el agar absorbió el líquido que acompaña al inóculo pero no más de 30 minutos. Luego se incubaron invertidas a 35°C por el término 72 horas y luego se procedió a realizar la lectura.⁷¹

3.5.1.9 Determinación del punto final- Lectura

- 1) Para determinar el punto final, La CIM se registrará como el valor de la menor dilución que inhibe completamente el desarrollo bacteriano, no se debe considerar el desarrollo de una simple colonia o una tenue película causada por el depósito del inóculo. El punto final en estos casos corresponderá a la concentración en la que haya más del 80 % de reducción del crecimiento comparado con el control.
- 2) Si persisten 2 o más colonias en concentraciones superiores al aparente punto final, o si se encuentra desarrollo a altas concentraciones y no a bajas, se debe controlar la pureza del cultivo y probablemente deba repetirse la prueba.⁷¹

3.5.2 Procesamiento de datos

Los datos de las observaciones se organizaron para cada una de las cepas y las concentraciones utilizadas. Igualmente se anotaron los resultados de los controles tanto positivos y negativos utilizados. Se elaboraron las tablas y gráficas.

Para el análisis se comparó los resultados obtenidos del efecto de la óleo-resina de *Copaifera officinalis* frente las diferentes cepas estudiadas, los controles positivos y negativos.

Debido a la complejidad de la metodología empleada, y el costo, el análisis de resultados y conclusiones se limitan a describir el impacto de las concentraciones del antimicrobiano utilizado sobre las bacterias periodontopatógenas empleadas. El experimento se repitió por duplicado, teniendo un tamaño de muestra 2, lo cual no permite realizar cálculos estadísticos, sólo descriptivos.

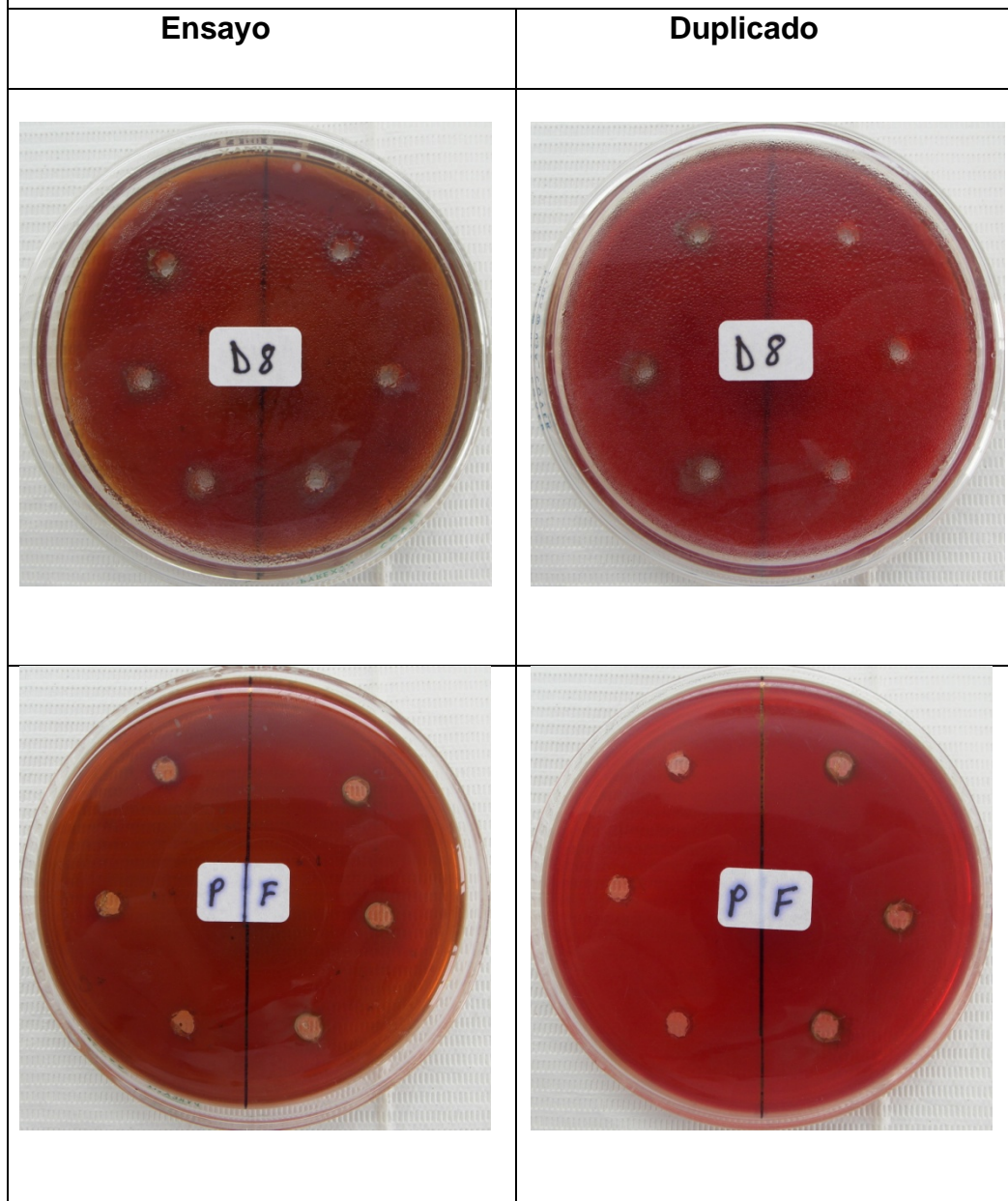
IV. Resultados

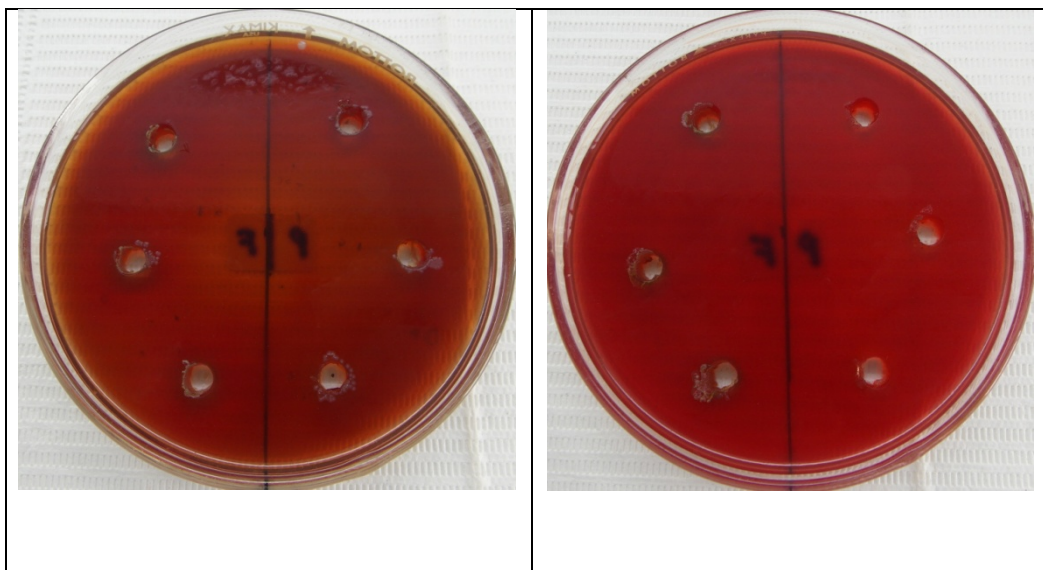
4.1 Determinación de CIM de *Copaifera officinalis* frente a *Porphyromona gingivalis*

Se estudió efecto antimicrobiano mediante la inhibición del crecimiento de las cepas en estudio por parte de la óleo-resina de *Copaifera officinalis* a distintas concentraciones, teniendo como referente un control positivo, Clorhexidina al 0.12%, y dos controles negativos, el Tween 80 y el medio agar schaedler puro.

Determinación de concentración inhibitoria mínima de *Copaifera officinalis* frente a *Porphyromona gingivalis*

Figura 1.-Placas de agar schaedler con óleo-resina de *Copaifera officinalis* al 0.78%





-A una concentración de óleo-resina de *Copaifera officinalis* de 0.78%, hubo crecimiento de colonias de *Porphyromona gingivalis*, por ende, la concentración inhibitoria mínima corresponde a 1.56%. Esa es la concentración requerida para inhibir su crecimiento

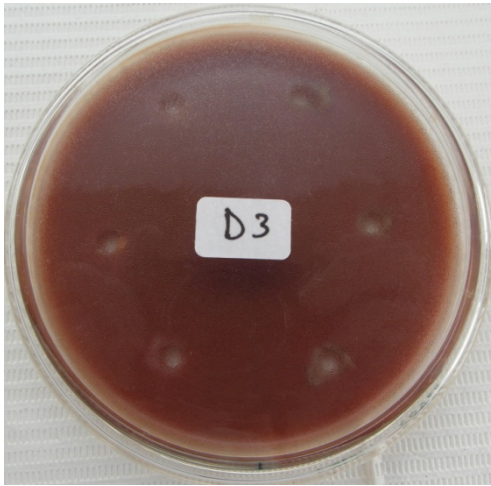

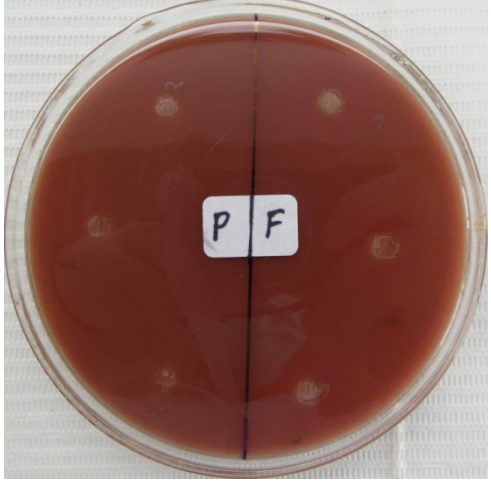
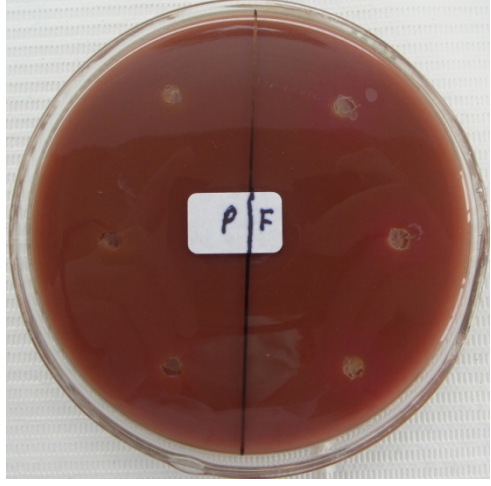
Figura 2.-Medio agar schaedler de control de crecimiento *Porphyromona gingivalis*

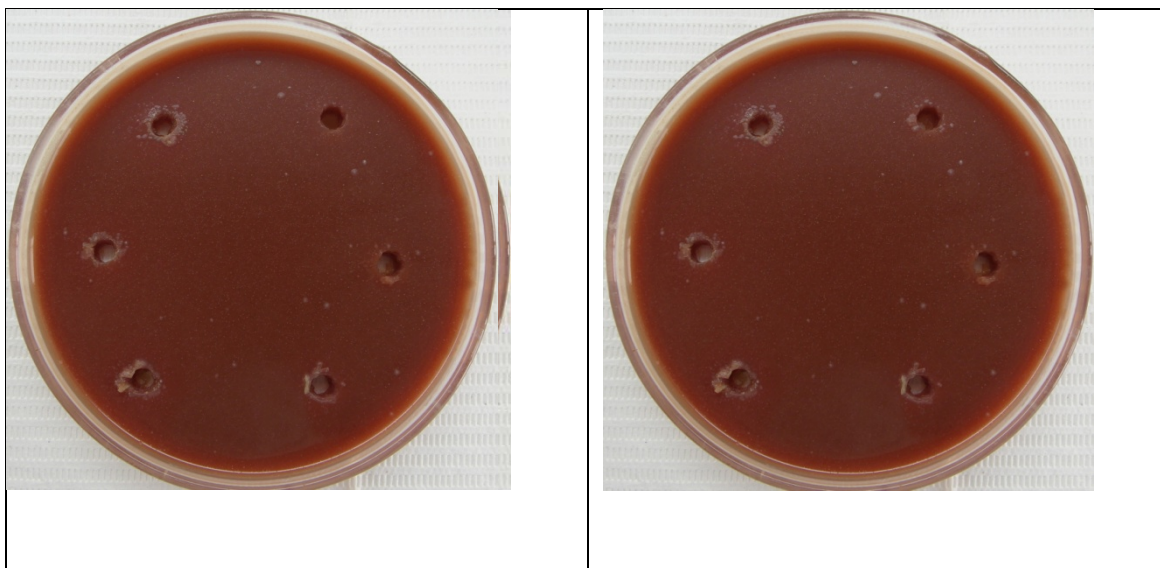


Efectivamente hubo crecimiento de *Porphyromona gingivalis*.

4.2 Determinación de concentración inhibitoria mínima de *Copaifera officinalis* frente a *Fusobacterium nucleatum*

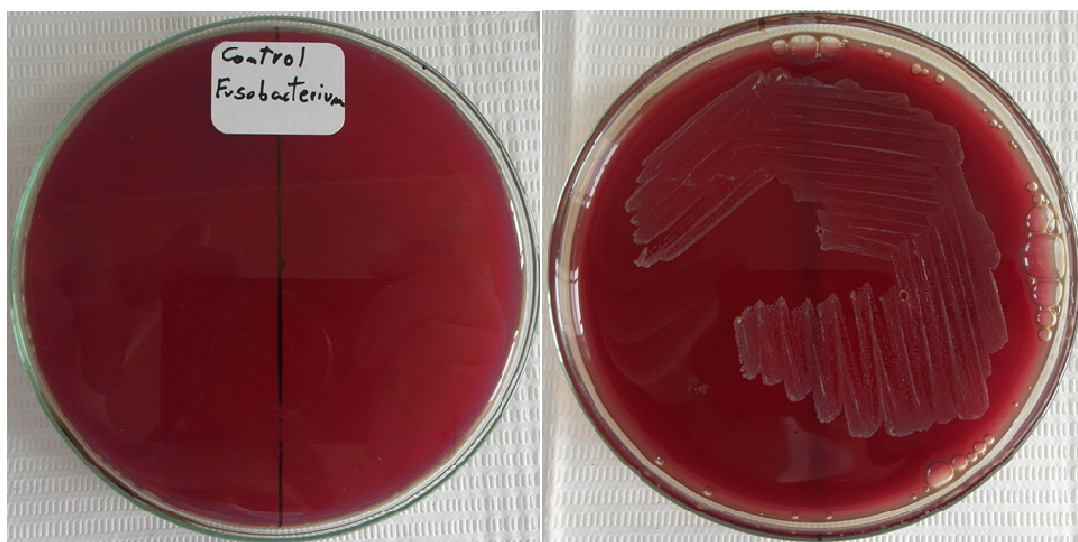
Figura 3.- Placas de agar schaedler con óleo-resina de *Copaifera officinalis* al 25%

Ensayo	Duplicado
	
	



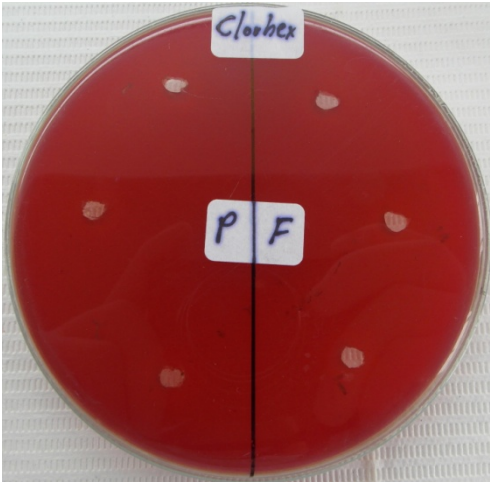
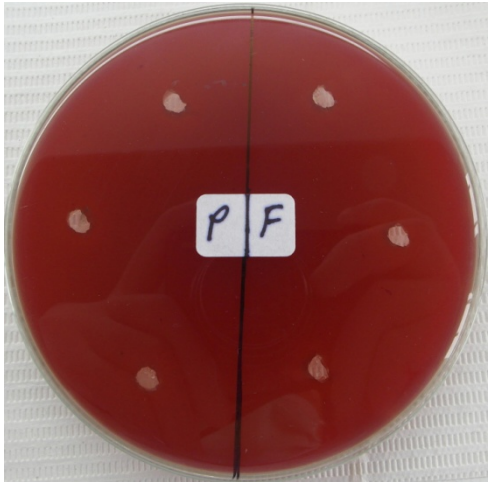
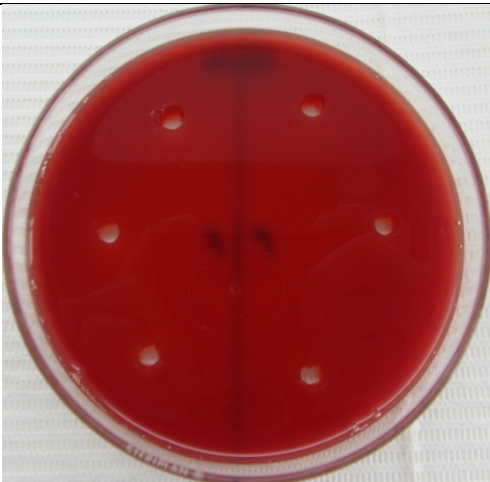
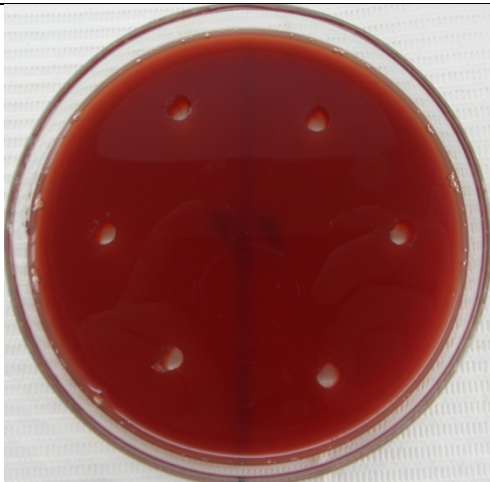
-A una concentración de óleo-resina de *Copaifera officinalis* de 25%, hubo crecimiento de colonias de *Porphyromona gingivalis*, por ende, la concentración inhibitoria mínima corresponde a 50%. Esa es la concentración requerida para inhibir su crecimiento.

Figura 4.- Medio agar schaedler de control de crecimiento de *F.nucleatum*

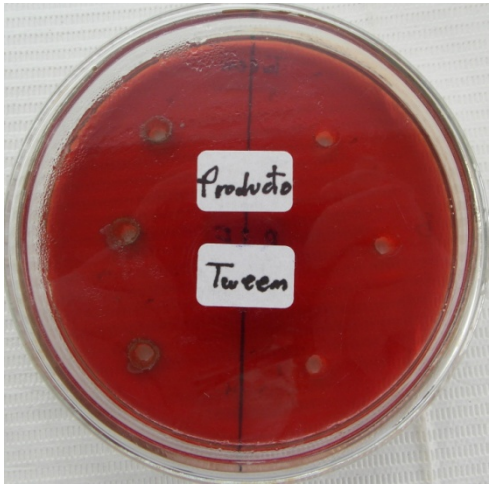

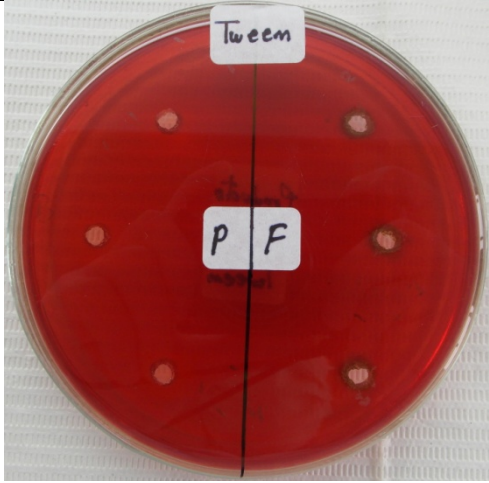
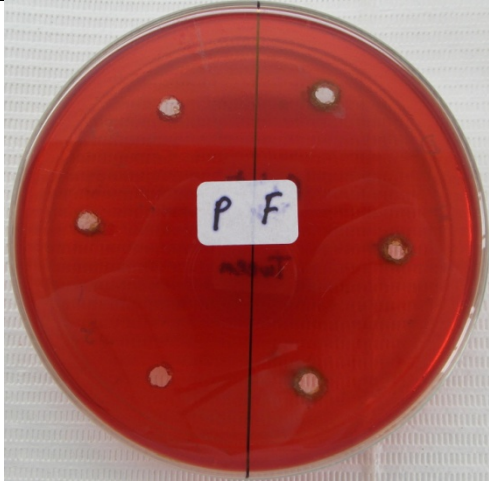


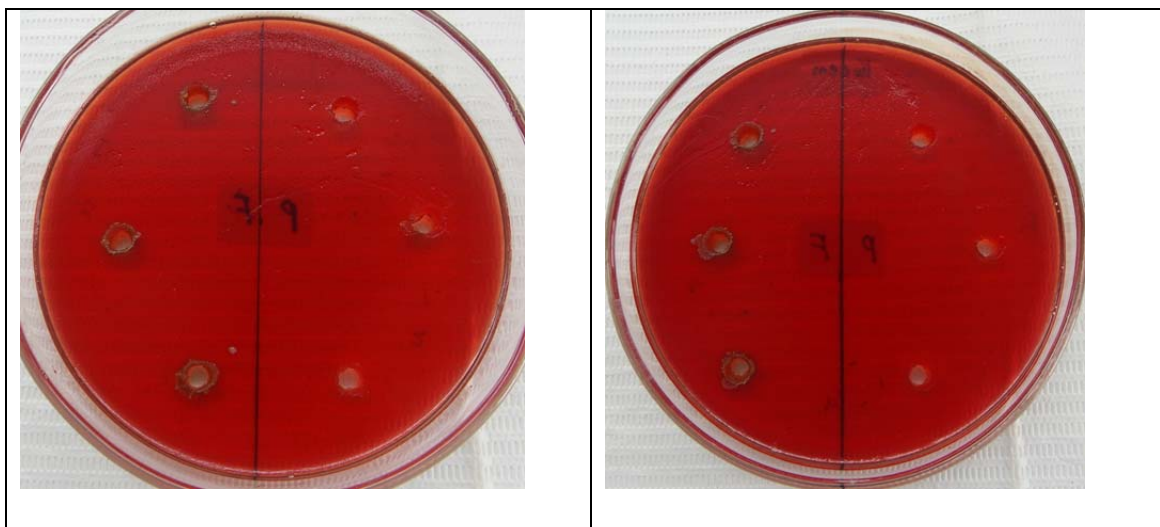
Efectivamente hubo crecimiento de *Fusobacterium nucleatum*

Medio agar schaedler con Clorhexidina al 0.12% como control positivo de acción antimicrobiana

Figura 5.- Placas de agar schaedler con Clorhexidina al 0.12%	
Ensayo	Duplicado
	
	

No hubo absolutamente ningún crecimiento en las placas con clorhexidina al 0.12%, mostrando lo efectiva que es la clorhexidina frente a estas dos cepas periodontopatógenas.

Figura 6.- Placas de agar schaedler con agente emulsificante Tween 80 - Blanco estéril	
Ensayo	Duplicado
	
	



Efectivamente, hubo crecimiento de ambas cepas bacterianas, lo que corrobora que el Tween 80 no tuvo ninguna acción antimicrobiana contra ellas.

4.3 Tablas y gráficos de resultados

Tabla N°2.- Determinación de efecto antimicrobiano de *Copaifera officinalis* y Concentración mínima inhibitoria sobre *Porphyromona gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*

Concentración %	Muestra de trabajo	Crecimiento bacteriano	
		Porphyromona gingivalis	Fusobacterium nucleatum
100	Placa N°1	No	No
50	Placa N°2	No	No
25	Placa N°3	No	Sí
12.5	Placa N°4	No	Sí
6.25	Placa N°5	No	Sí
3.12	Placa N°6	No	Sí
1.56	Placa N°7	No	Sí
0.78	Placa N°8	Sí	Sí
0.39	Placa N°9	Sí	Sí
0.19	Placa N°10	Sí	Sí

Se observa claramente que a partir de la dilución 0,78% hay crecimiento de *P.gingivalis* por lo que la CIM se hace evidente en 1.56%, mientras que a partir de la dilución al 25% crece el *Fusobacterium nucleatum*, dando la CIM en dilución al 50%.

Tabla N°3.- Crecimiento de *Porphyromona gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* frente a Clorhexidina al 0.12% como control positivo

Concentración %	Muestra control positivo	Crecimiento bacteriano	
		Porphyromona gingivalis	Fusobacterium nucleatum
0.12	Placa N°1	No	No

No hubo crecimiento de ninguna de las dos bacterias.

Tabla N°4.- Crecimiento de *Porphyromona gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* frente a agente emulsificante Tween 80 como blanco estéril

Concentración %	Muestra blanco estéril	Crecimiento bacteriano	
		Porphyromona gingivalis	Fusobacterium nucleatum
100	Placa N°1	Sí	Sí

Hubo crecimiento de ambas bacterias, descartando así algún tipo de influencia del Tween 80 en los resultados del efecto antimicrobiano obtenido.

Duplicado del experimento

Tabla Nº5.- Ensayo duplicado de determinación de efecto antimicrobiano de *Copaifera officinalis* y Concentración mínima inhibitoria sobre *Porphyromona gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*

Concentración %	Duplicado	Crecimiento bacteriano	
		Porphyromona gingivalis	Fusobacterium nucleatum
100	Placa Nº1	No	No
50	Placa Nº2	No	No
25	Placa Nº3	No	Sí
12.5	Placa Nº4	No	Sí
6.25	Placa Nº5	No	Sí
3.12	Placa Nº6	No	Sí
1.56	Placa Nº7	No	Sí
0.78	Placa Nº8	Sí	Sí
0.39	Placa Nº9	No	Sí
0.19	Placa Nº10	No	Sí

Se vuelve a encontrar y corroborar CIM para *P.gingivalis* a la dilución al 1.56% y CIM para *F.nucleatum* al 50%.

Tabla Nº6.-Ensayo duplicado de Crecimiento de *Porphyromona gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* frente a Clorhexidina al 0.12% como control positivo

Concentración %	Muestra control positivo	Crecimiento bacteriano	
		Porphyromona gingivalis	Fusobacterium nucleatum
0.12	Duplicado	No	No

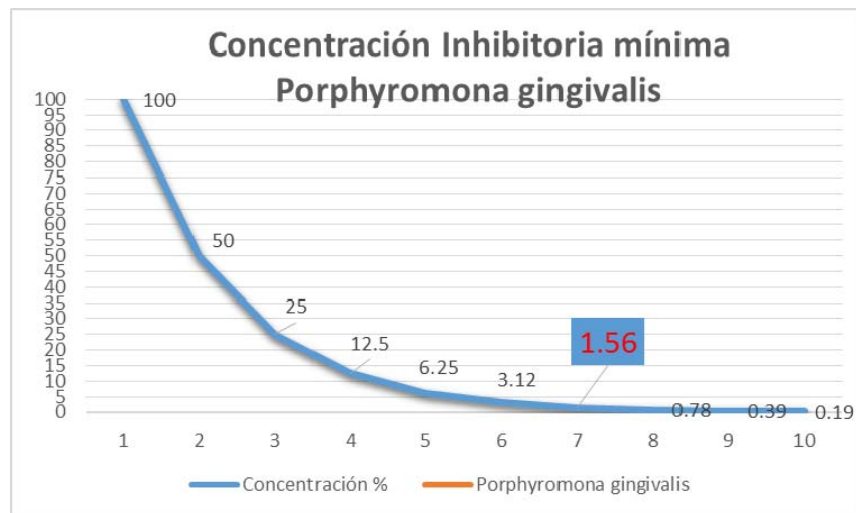
Se corrobora la efectividad de la clorhexidina al 0.12% al impedir el desarrollo de ambas bacterias en estudio.

Tabla N°7.- Ensayo duplicado de Crecimiento de *Porphyromona gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* frente a agente emulsificante Tween 80 como blanco estéril

Concentración %	Muestra blanco estéril	Crecimiento bacteriano	
		Porphyromona gingivalis	Fusobacterium nucleatum
100	Duplicado	No	Sí

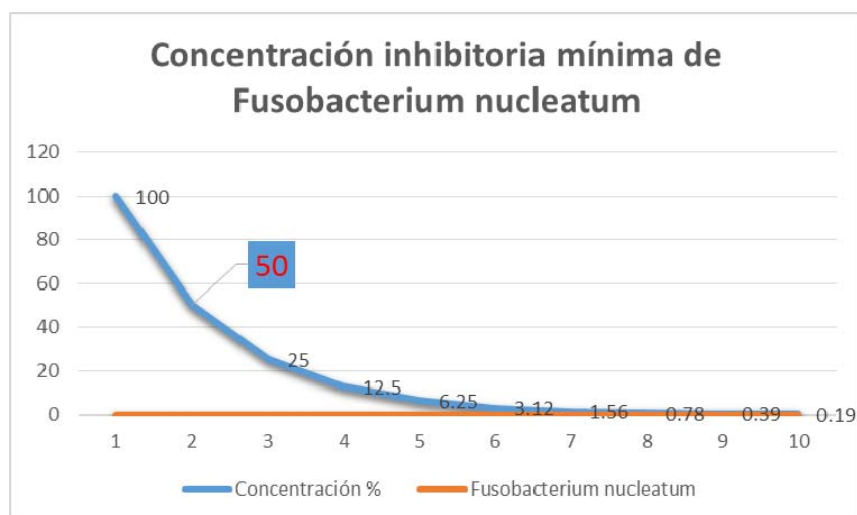
Al duplicar el ensayo y ser la última placa Petri en ser inoculada, sólo creció el *F.nucleatum* más no la *P.gingivalis* que puede haberse debido a que la bacteria murió al estar expuesta a un medio aerobio. Sin embargo, se corrobora la no influencia de Tween 80 sobre el efecto antimicrobiano.

Gráfico N°1.- Concentración inhibitoria mínima de *Copaifera officinalis* sobre *Porphyromona gingivalis*



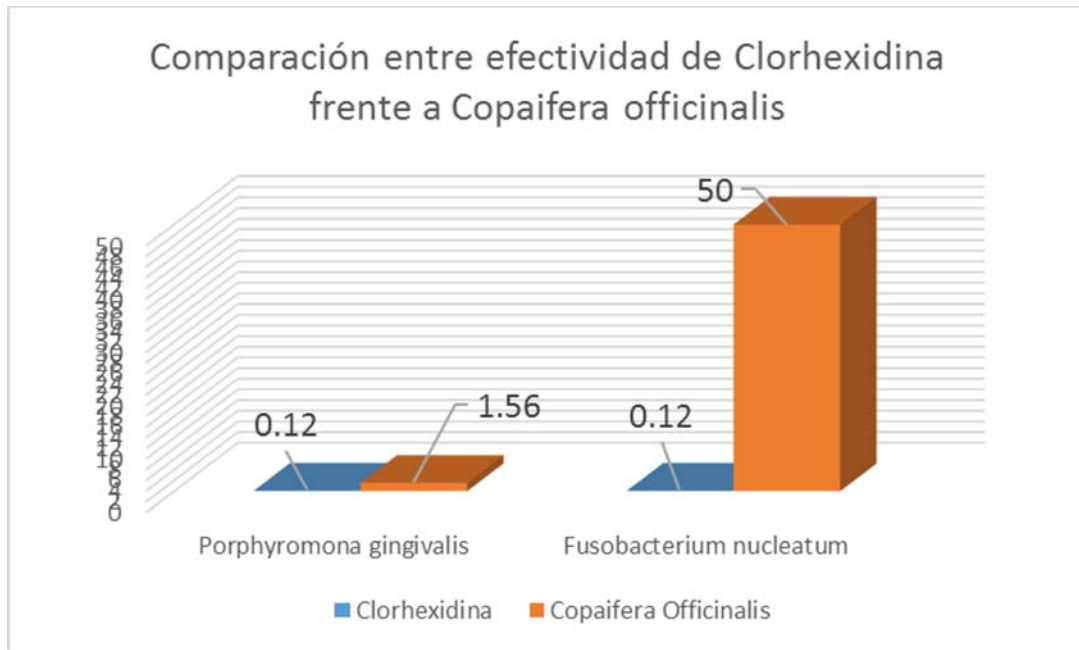
Se representa la CIM para *P.gingivalis* de la óleo-resina de *Copaifera officinalis* que representa la dilución al 1.56%, concentración que impide el crecimiento.

Gráfico N°2.- Concentración inhibitoria mínima de *Copaifera officinalis* sobre *Fusobacterium nucleatum*



Se representa la CIM para *F.nucleatum* de la óleo-resina de *Copaifera officinalis* que representa la dilución al 50%,concentración que impide el crecimiento.

Gráfico N°3.- Comparación entre el efecto de Clorhexidina en comparación a *Copaifera officinalis*



Se observa que la clorhexidina es más efectiva contra las cepas estudiadas, al necesitar menos concentración para evitar el crecimiento.

Al comparar el efecto de la clorhexidina al 0.12% frente al efecto de la óleo-resina de *Copaifera officinalis*, se observa una mayor efectividad de parte de la clorhexidina.

Se requiere el óleo-resina de *Copaifera officinalis* al 50% para causar la inhibición de *Fusobacterium nucleatum*. Con la clorhexidina al 0.12% es suficiente para impedir su total crecimiento.

Se requiere el óleo-resina de *Copaifera officinalis* al 1.56% para causar la inhibición de *Porphyromona gingivalis*. Con la clorhexidina al 0.12% es suficiente para impedir su total crecimiento.

V. Discusiones

En la actualidad, encontramos numerosas investigaciones dirigidas a la búsqueda de nuevos compuestos con actividades antimicrobianas a partir de fuentes naturales, dentro de ellos un considerable número estudios han evaluado la actividad antimicrobiana de extractos, aceites y aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas.

La *Copaifera officinalis*, de nombre común copaiba, se ha venido utilizando ampliamente en la medicina tradicional por todas las propiedades que se le atribuyen: como antiinflamatorio y analgésico¹⁸ (Matos et al., 2007), antiséptico y cicatrizante de heridas¹⁹ (Brito et al., 2005), con acción citotóxica y anticancerosa²⁰ (Matos et al., 2008), actividad antimicrobiana²¹ (Santos et al., 2008), entre otras.

En la presente investigación, se propuso validar la actividad antimicrobiana encontrando la CIM de la óleo-resina de *Copaifera officinalis* sobre las cepas periodontopatógenas de *Porphyromona gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*.

Martins Mussi 2011⁸, realizo pruebas de la concentración mínima inhibitoria y de la concentración mínima bactericida de *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis* relacionadas a la clorhexidina y los aceites derivados de *Copafeira officinalis* y *Melaleuca alternifolia*. En esta investigación, se utilizó la óleo-resina pura obtenida de la corteza del árbol de *Copaifera officinalis*, aplicando la metodología de dilución en agar que nos permite evaluar la actividad antimicrobiana mediante la obtención de la CIM, contra *Porphyromona gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*. Mussi empleó una metodología muy similar a la del presente estudio, con la diferencia de que Mussi estableció sus concentraciones para el método de dilución en agar, mientras que en el presente estudio nos basamos en las 10 concentraciones que estipula el método de dilución en caldo, que se aplica a la dilución en agar.

Los resultados encontrados en el presente estudio, confirman lo estudiado por Mussi, ya que la *Porphyromona gingivalis* fue más sensible en comparación al *Fusobacterium nucleatum* que fue más resistente. Aunque, al utilizar un aceite derivado de *Copaifera officinalis*, es decir, más libre de impurezas, requirió menor concentración para inhibir el crecimiento de ambas cepas estudiadas.

Por otro lado, Díaz Suyo JA y Proaño-de Casalino D.⁷³, buscó comparar la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa, Perú, en concentraciones al 1%, 5% y 10% con gluconato de clorhexidina al 0,2% sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 y *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586. La actividad antibacteriana se determinó usando el método de difusión en el agar.

Se cita este artículo para presentar el contraste en el empleo de la metodología. En el presente estudio se realizó el método de dilución en agar, el cual solo permite determinar el efecto antimicrobiano al evaluar si existe o no una concentración inhibitoria mínima, es decir, si el antimicrobiano empleado es en primera instancia bacteriostático. La metodología a emplear, la dicta el tipo de bacterias en el estudio. Basados en la literatura, en el texto de referencia el Negroni M., Microbiología estomatológica. Fundamentos y guía práctica, cita que la desventaja de emplear el método de difusión en agar, es que solo permite su uso en bacterias aerobias de crecimiento rápido, en este estudio se emplearon bacterias anaerobias, y en caso de la *Porphyromona gingivalis*, bacteria anaerobia estricta, cuyo crecimiento para el presente estudio tardó 2 semanas. Además, nos basamos en la técnica de dilución en agar pues es la estipulada por el Clinical and Laboratory Institute (CLSI) para todas las bacterias anaerobias.⁸

Por otro lado, el presente estudio muestra concordancia con lo encontrado por Pieri et al 2010⁶, que evaluaron el potencial del uso del óleo de copaiba (*Copaifera officinalis*) en la prevención de la dolencia periodontal, eliminando su agente etiológico, utilizando 18 canes, un estudio experimental.

Esto, debido a que luego de su análisis de los ensayos de difusión e inhibición de la adherencia, mostró superioridad el grupo de copaiba en relación a los otros grupos ($p < 0,05$) que emplearon. Concluyeron que el uso del óleo de copaiba en la prevención de la dolencia periodontal es como un posible sustituto de la clorhexidina en la terapia antimicrobiana oral. Sin embargo, en el presente estudio, la clorhexidina tuvo más efecto a menor concentración en relación al óleo-resina de *Copaifera officinalis*, pero es un posible sustituto que a mayores concentraciones realizará el efecto de la clorhexidina prescindiendo de sus efectos secundarios no deseados.

VI. Conclusiones

1. La óleo-resina de *Copaifera officinalis* presentó efecto antimicrobiano frente a la cepa ATCC de *Porphyromona gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*.
2. Se determinó que la concentración inhibitoria mínima de la óleo-resina de *Copaifera officinalis* frente a *Porphyromona gingivalis* fue del 1.56%.
3. Se determinó que la concentración inhibitoria mínima de la óleo-reina de *Copaifera officinalis* frente a *Fusobacterium nucleatum* fue del 50%.
4. La *Porphyromona gingivalis* es más susceptible al efecto antimicrobiano de la óleo-resina de *Copaifera officinalis* en comparación al *Fusobacterium nucleatum* que es más resistente, pues requiere mucha más concentración para ser inhibido.
5. La clorhexidina al 0.12% es más efectiva que la óleo-resina de *Copaifera officinalis* en la inhibición del crecimiento de *Fusobacterium nucleatum* y de la *Porphyromona gingivalis*, al requerirse una menor concentración de ésta para que presente efecto antibacteriano.

VII. Recomendaciones

1. Hacer estudios para determinar la CBM de la óleo-resina de *Copaífera officinalis* sobre las cepas estudiadas: *Porphyromona gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* y realizar trabajos posteriores con mayor cantidad de ensayos.
2. Determinar el efecto antimicrobiano de la óleo-resina de *Copaífera officinalis* frente a otros microorganismos patógenos de la cavidad oral.
3. Realizar estudios posteriores con las otras especies abundantes en el país de *Copaífera officinalis*.

VIII. Bibliografía

1. Soares KM, Fitoterapia, “Uma opção para o tratamento odontológico”, Revista Saúde 2010, 4(1).
2. Veiga Junior V. et al, “Constituintes das sementes de *Copaifera officinalis*”, Revista Acta Amazônica, 2007, 37(1):123-126.
3. Ministerio de Salud. Estudio Nacional de Salud oral ENSAB III. Extensión y severidad de la enfermedad periodontal. Bogotá: Ministerio de Salud; 1999.
4. Planells Dp y Riobóo CM, Problemas periodontales en el niño. En: Boj de odontopediatría: La evolución del niño al adulto joven, Madrid, Editorial Medica Ripano, 2011.
5. Soares K.A. et al, “Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera offi cinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium offi cinale*, própolis e mel em voluntarios saudáveis”, Revista brasileira de farmacognosia, 2006, 16(4): 447-454.
6. Pieri F.A, Mussi M.C, Fiorini J.E, Schneedorf J.M,” Efeitos clínicos e microbiológicos do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) sobre bactérias formadoras de placa dental em cães”, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 2010, 62(3): 578-585.
7. Oliveira dos Santos A. et al, “Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus”, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, May 2008, 103(3): 277-281.
8. Mussi M.C, “Análise da atividade antimicrobiana dos óleos de copaíba (*Copaifera officinalis*) e da melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) sobre *Fusobacterium nucleatum* e *Por phyromonas gingivalis*: determinação das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas e efeito de concentrações subinibitórias sobre a agregação”, Tese para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas, Bauru, 2011.
9. Pieri F.a, Silva V.O, Souza C.F, Costa J.C.M, Santos L.F, Moreira M.A.S, “Antimicrobial profile screening of two oils of *Copaifera* genus”, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 2012, 64(1): 241-244.

10. Reis E.B, “Determinação do potencial antibacteriano de óleos essenciais frente a bactérias bucais potencialmente patogênicas”, Universidade de Franca, 2010.
11. Pieri F.A, Mussi M.C, Fiorini J.E, Schneedorf J.M , “Bacteriostatic Effect of Copaiba Oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*”, *Braz Dent J* 2012, 23(1): 36-38.
12. Manara LRB, Anconi SI, Gromatzky A, Conde MC, Bretz WA. Utilização da própolis em odontologia. *Rev FOB*. 1999; 7(3/4):15-20.
13. Groppo FC, Ramacciato JC, Simões RP, Flório FM, Sartoratto A. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. *Int Dent J*. 2002; 52(6):433-7.
14. Lafont J., Páez M., Lans E., “Composición fisicoquímica de la semilla y del aceite de la semilla del Canime (*Copaifera officinalis* L)”, *Información Tecnológica* 2011, 22(3):19-26.
15. Silva, R., Vieira, G; *Sustainability of extraction and production of copaiba (Copaifera multijuga Hayne oleoresin in Manaus, AM, Brazil*, *Forest Ecology and Management*.2008. 256, 282-288.
16. Chen, F. y otros siete autores; *Within-plant distribution and emission of sesquiterpenes from Copaifera officinalis*, *Plant Physiology and Biochemistry*.2009. 47, 1017–1023.
17. Sant’Anna, B.M., Paredes, S., Pinto, A.C., Rezende, C; *Characterization of Woody Odorant contributors in copaiba oil (Copaifera multijuga Hayne)*, *Journal Brazilian Chemical Society*.2007. 18, 984-989.
18. Matos.N., C. Moraes., S. Paredes., M. E. Matheus., P. Dias; *Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oil*, *Journal of Ethnopharmacology*.2007. 109, 486–492.
19. Brito, M.V., y otros cinco autores; *Copaiba oil effect on urea and creatinine serum levels in rats submitted to kidney ischemia and reperfusion syndrome*, *Acta Cirurgica Brasileira*.2005. 20, 243-246.
20. Matos.N. y otros siete autores; *Antineoplastic activity of Copaifera multijuga oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor*, *Journal of Ethnopharmacology*.2008. 119, 179-184.

21. Santos, A.O., y otros cinco autores; *Effect of Brazilian copaiba oils on Leishmania amazonensis*, Journal of Ethnopharmacology.2008. 120, 204-208.
22. Basile, A. C.; et al. Anti-inflammatory activity of oleo resin from Brazilian *copaifera*. J. Ethnopharmacol., jan 1988,22(1):101-109.
23. Valverde, R. S. Avaliação da atividade antifúngica dos extratos brutos etanólicos de: *Cucurbita pepo*, *Remirea marítima* Cayaponiatayuya, *Eucaliptos citriodora*, *Cuminumcyminum* e Óleo Resina de Copaíba sobre leveduras do Gênero *Cândida*. 2007. Dissertação (Mestrado em odontologia). Universidade Potiguar, Natal, 2007.
24. Martins, I. F. B.; Silva, A. Influência do óleo de copaíba (*copaifera sp.*) no tratamento de ferida cutânea infeccionada. Rev. Pesquisa: cuidado é Fundamental-online, 2010, 2:526-529.
25. Arroyo, J. et al. Efecto citoprotector y antisecretor del aceite de *Copaifera officinalis* en lesiones gástricas inducidas en ratas. An. Fac. Med., Lima, jun 2009, 70(2): 89-96.
26. Aaujo Junior, F. A. et al. Efeito do óleo de copaíba nas aminotransferases de ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática com e sem pré-condicionamento isquêmico. Acta Cir. Bras., São Paulo, 2005, 20(1): 93-99.
27. Chicaro, C. F. Análise da expressão da proteína nf-kappaB antes e depois do tratamento com dexametasona e os óleos de copaíba e andiroba em cultura de células de carcinoma epidermóide bucal. 2009. 125f. Dissertação (Mestrado em odontologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo,2009.
28. Gomes, N. M. et al. Antinociceptive activity of Amazonian Copaíba oils. J. Ethnopharmacol.2007, 109(3):486–492.
29. Mariotti A.A primer on inflammation. Compend Contin Educ Dent. 2004. 25(1), 7:15.
30. Brown LJ, Loe H. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. Periodontol 2000.1993;2:57-71.
31. Sheiham A, Netuveli GS.Periodontal diseases in Europe.Periodontol 2000.2002;29:104-21
32. Löe H, Thilander E, Jenses SB.Experimental gingivitis in Man. J Periodontol. 1965; 36:177-87.

33. Ristic M, Vlahovic Svabic M, Sasic M, Zelic O. Clinical and microbiological effects of fixed orthodontic appliances on periodontal tissues in adolescents. *Orthod craniofac Res.* 2007; 10(4):187-95.
34. Nasim VS, Shetty YR, Hegde AM. Dental health status in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Pediatr Dent.* 2007; 31(3):210-3.
35. Okolo S, Chukwu G, Egbunu I, Ezeogu F, Onwuanaku C, Adeleke O, et al. Oral hygiene and nutritional status of children aged 1-7 years in a rural community. *Ghana Med J.* 2006; 40(1):22-5.
36. Bimstein E. Periodontal health and disease in children and adolescents. *Pediatr Clin North Am.* 1991; 38(5):1183-207.
37. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999; 4(1):1-6.
38. Jamison HC. Prevalence of periodontal disease of the deciduous teeth. *J A; dent Assoc.* 1963; 66:207-15.
39. López R, Fernández O, Jara G, Baelum V. Epidemiology of clinical attachment loss in adolescents. *J Periodontol.* 2001; 72(12):1666-74.
40. Clerehugh V, Tugnait A. Diagnosis and management of periodontal diseases in children and adolescents. *Periodontol 2000.* 2001; 26:146-68.
41. Tonetti MS, Mombelli A. Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol.* 1999; 4(1):39-53.
42. Meyle J, Gonzáñez JR. Influences of systemic diseases on periodontitis in children and adolescents. *Periodontol 2000.* 2001; 26:92-112.
43. Sollecito TP, Sullivan KE, Pinto A, Stewart J, Korostokk J. Systemic conditions associated with periodontitis in childhood and adolescence. A review of diagnostic possibilities. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2005; 10(2):142-50
44. Meyle J. Leukocyte adhesion deficiency and prepubertal periodontitis. *Periodontol 2000.* 1994; 6:26-36.
45. Schmidt AM, Weidman E, Lall E. Advanced glycation end products induce oxidant stress in the gingiva: a potential mechanism underlying accelerated periodontal disease associated with diabetes. *J Periodontol.* 1996; 31: 508-515.

46. Offenbacher S, Pared HL, O'Reilly PG, Wells SR, Salvi GE, Lawrence HP, Socransky. Potential pathogenic mechanism of periodontitis associated pregnancy complications. *Ann Periodontol*. 1998; 3: 233-250.
47. López N, Smith P, Gutierrez J. Higher risk of preterm birth and low birth weight in women with periodontal disease. *J Dent Res*. 2002; 1: 58–63.
48. Ebersole LJ, Cappelli D. Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. *Periodontol 2000*. 2000; 23: 19-49.
49. Fuertes L, Del Valle O, Justo M, Lemus L, Fernández J, Evidencias que demuestran la relación entre las enfermedades periodontales y las cardiovasculares. *Rev haban cienc méd La Habana*, 2008, 7(4).
50. Peña M, Calzado M, Gonzáles M, Cordero S, Azahares H, Patógenos periodontales y sus relaciones con enfermedades sistémicas, Cuba, *Medisan* 2012, 16(7):1137.
51. Yilmaz O. The chronicles of *Porphyromona gingivalis*: the microbium, the human oral epithelium and their interplay. *NIH Microbiology*. 2008; 154(10): 2897-2903.
52. Brunner J, Scheres N, El Idrissi NB, Deng DM, Laine ML, Van Winkelhoff AJ. The capsule of *Porphyromona gingivalis* reduces the immune response of human gingival fibroblasts. *BMC Microbiology*. 2010; 10(5): 1-11.
53. Shah HN, Collins MD. Proposal for reclassification of *Bacteroides assaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromona*. *Int J Syst Bacteriol* 1988; 38(1): 128-131.
54. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the Gum line: Pathogenic Mechanisms of *Porphyromona gingivalis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998; 62(4): 1244-1263.
55. Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromona gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* : the “Red Complex”, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000*. 2005; 38:72-122.
56. Díaz J, Yáñez J, Melgar S, Álvarez C, Rojas C, Vernal R, Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral. 2012, 5(1): 40-5.
57. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the Gum line: Pathogenic Mechanisms of *Porphyromona gingivalis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998; 62(4): 1244-1263.

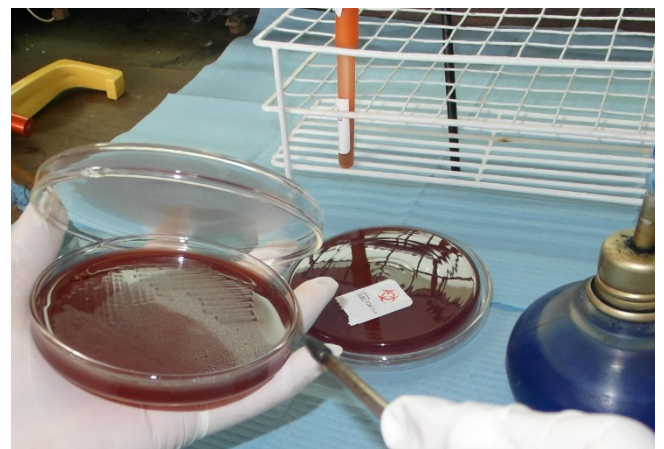
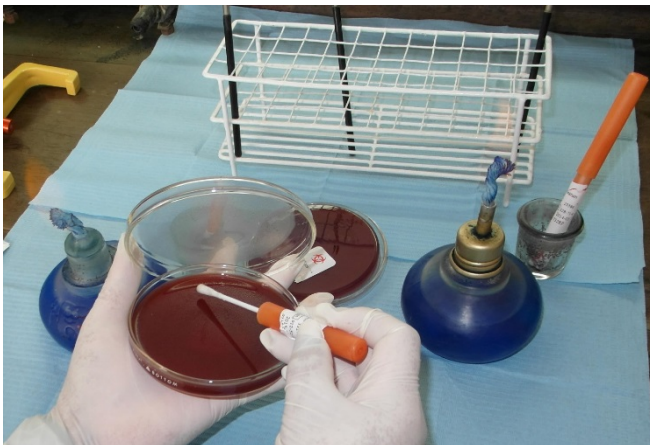
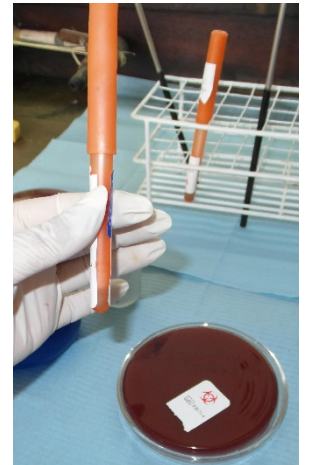
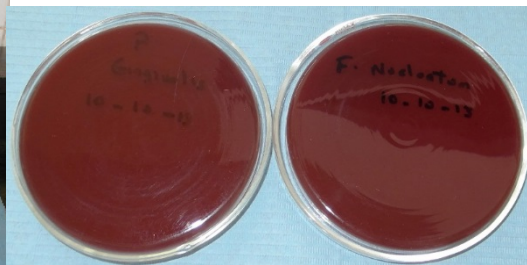
58. Watson MR, Bretz WA, Loesche WJ. Presence of *Treponema denticola* and *Porphyromona gingivalis* in children correlated with periodontal disease of their parents. *J. Dent. Res.* 1994; 73(10): 1636-1640.
59. Ardila Medina CM, Lafaurie Villamil GI. *Asociación entre porphyromona gingivalis y proteína C reactiva en enfermedades sistémicas inflamatorias*. *Av Periodon Implantol.* 2010; 22, 1: 45-53
60. Slots J. Rapid identification of import periodontal microorganisms by cultivation . *Oral Microbiol. Immunol.* 1986; 1: 48-55.
61. Ramos PD, Moromi NH, Martinez CE, Mendoza RA. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: patógeno importante en la periodontitis. *Odontol. Sanmarquina* 2010; 13(2): 42-45
62. Ramos PD, Moromi NH, Martinez CE, “Porphyromona gingivalis: patógeno predominante en la periodontitis crónica”, *Odontol. Sanmarquina* 2011; 14(1): 34-38.
63. Bolstad, Jenses, Bakken, Taxonomy, Biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*, *Clinical Microbiology Reviews*, 1996, 55-71.
64. Mila Fernandes MM, Aspectos clínicos, ecológicos e taxonômicos do gênero *Fusobacterium*. Monografia de conclusão do Curso de Especialização em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.
65. Kolenbrander, P. E., and J. London. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J. Bacteriol.* 1993 175:3247–3252.
66. Holt, S. C., and T. E. Bramanti. Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1991, 2:177–281.
67. Diaz PI, Zilm PS, Rogers AH, *Fusobacterium nucleatum* supports the growth of *Porphyromona gingivalis* in oxygenated and carbón-dioxide-depleted environments, *Microbiology*, 2002,148:467-472.
68. Llop Hernández A., Váldez-Dapena Vivanco M., Zuazo Silva J., Bacilos y cocos gramnegativos anaerobios. En Martinez Izquierdo A., Ginebra Gonzáles O., Editores. *Microbiología y Parasitología Médica*. Tomo I. Ciudad de La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2001.

69. Avello LM, Cisternas FI. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. Rev. méd. Chile [revista en la Internet]. 2010 Oct [citado 2013 Ene 14];38(10):1288-1293. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003498872010001100014&lng=es. doi: 10.4067/S0034-98872010001100014.
70. Negroni M., Microbiología estomatológica. Fundamentos y guía práctica. 2 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009.
71. Ministerio de Salud, Manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos, Buenos Aires: Instituto Nacional de enfermedades infecciosas; 2001.
72. Ministerio de Salud del Perú, Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión, Lima: Instituto Nacional de Salud; 2002.
73. Díaz-Suyo JA, Proaño-de Casalino D. Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa-Perú, sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*. Rev Estomatol Herediana. 2011; 21(3):125-130.

VI.- ANEXOS



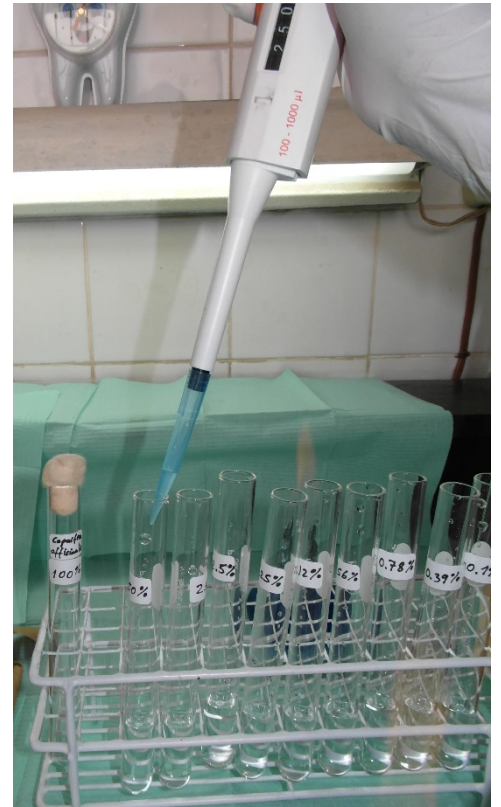
Reactivación de cepas

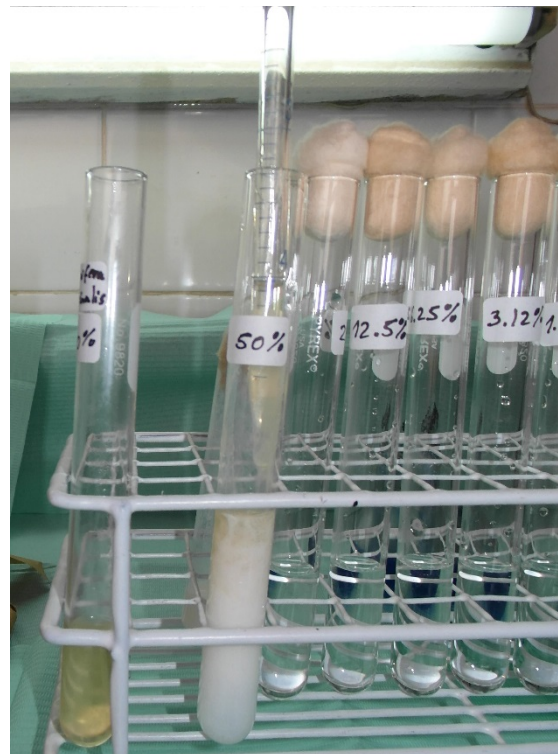


Procedimiento

Preparación de concentraciones de óleo-resina de *Copaífera officinalis*











Matraces con agar Schaedler fundido

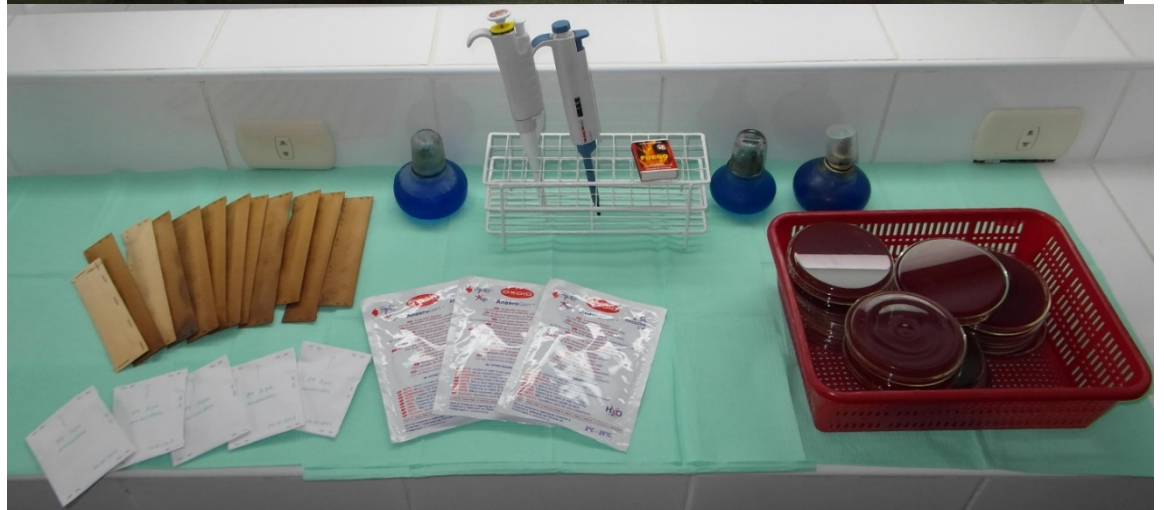
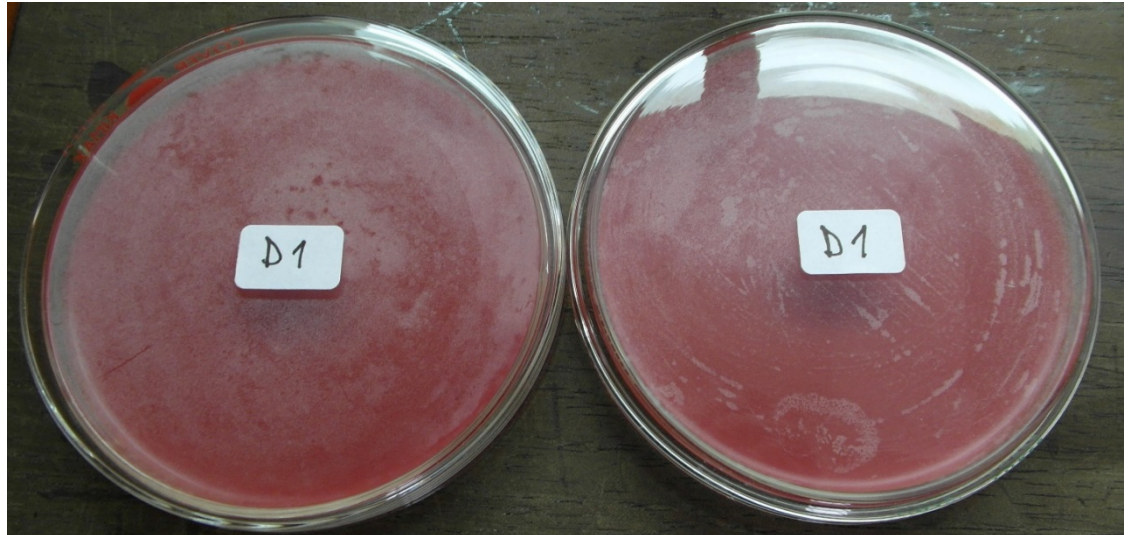


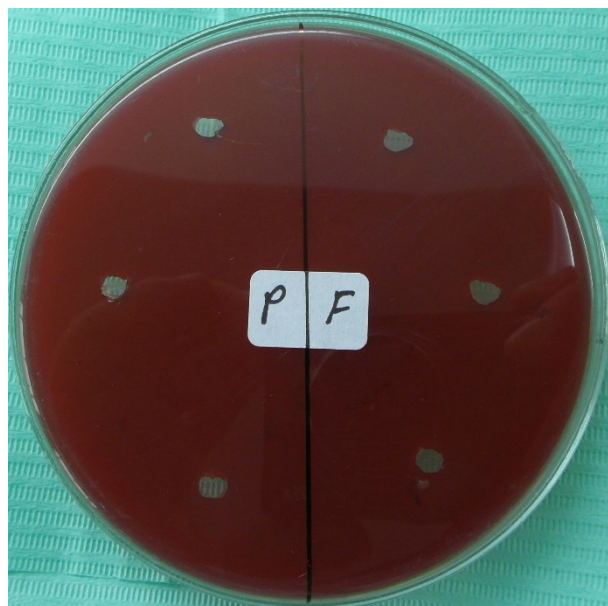
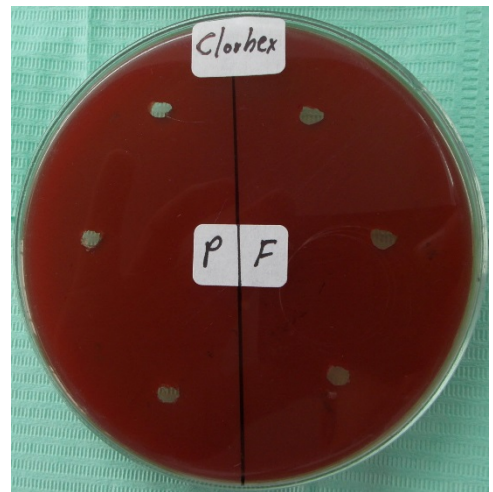
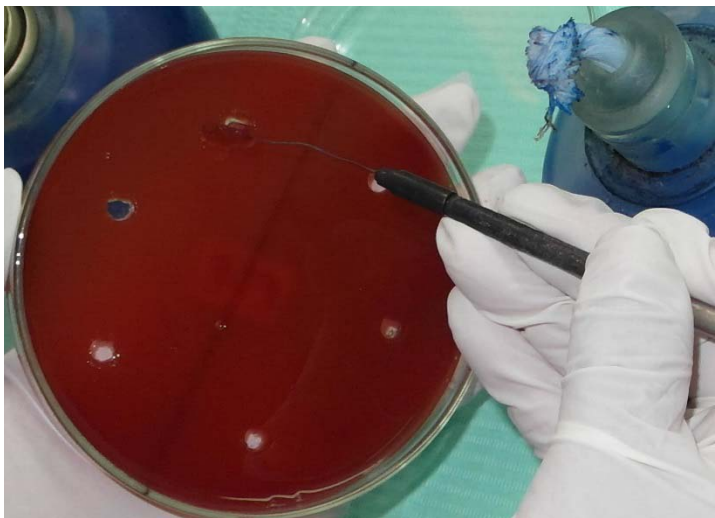
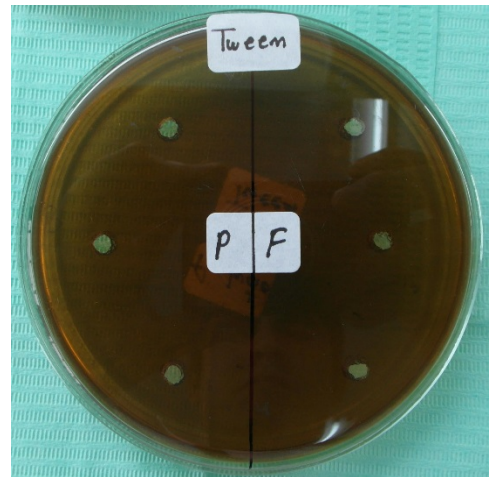
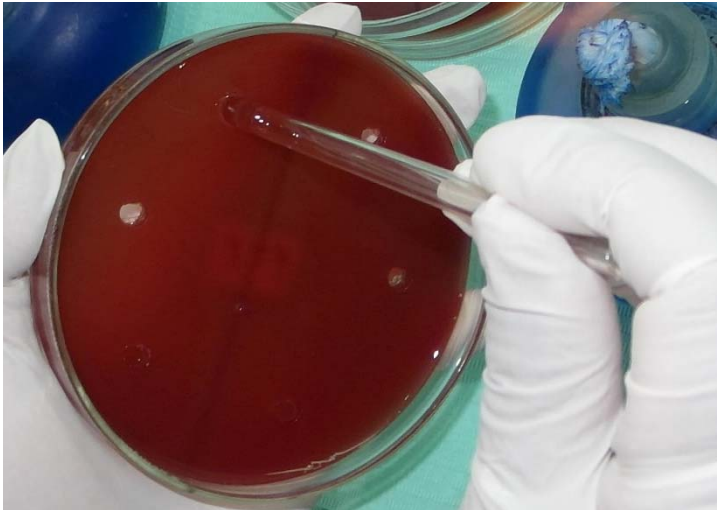


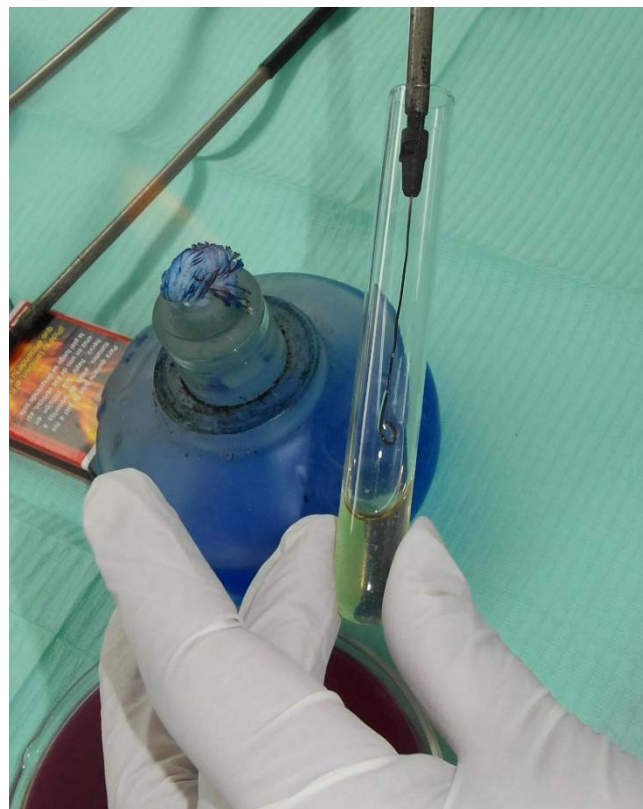
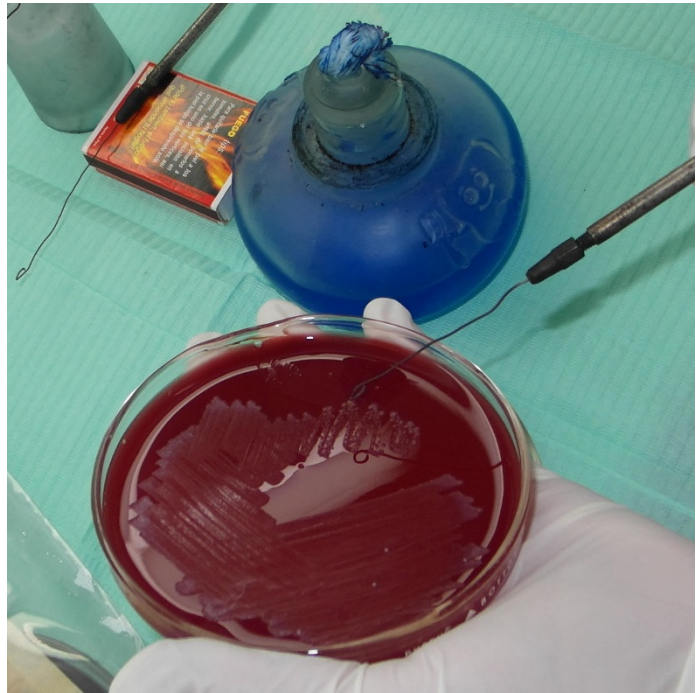


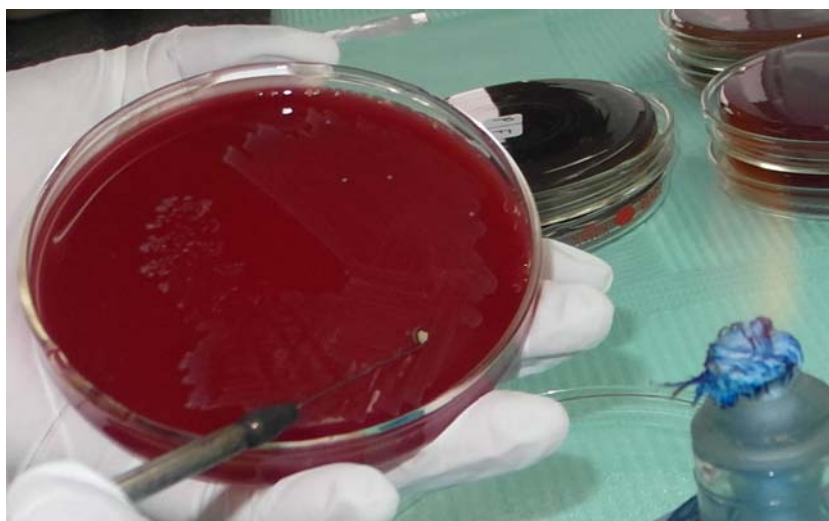
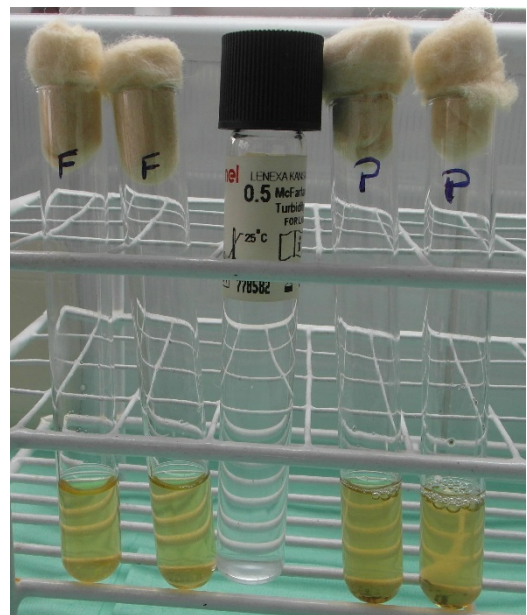
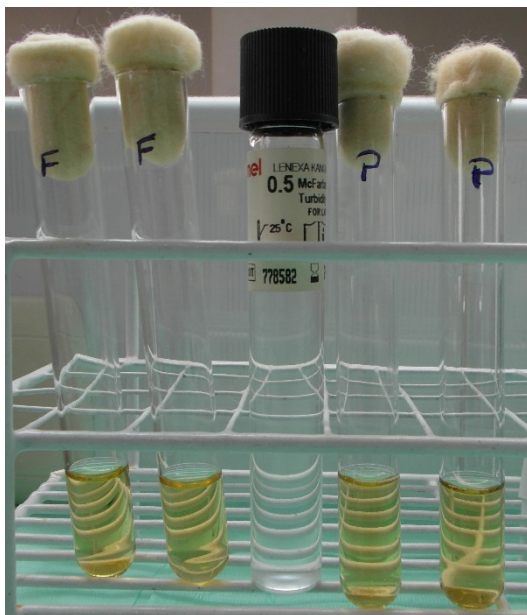
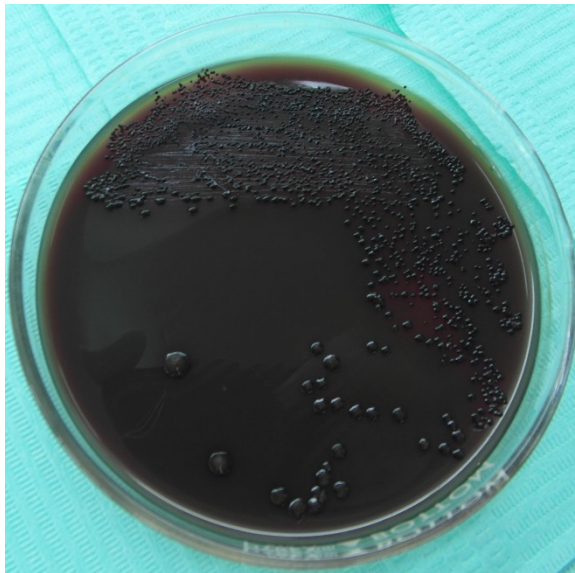
Preparación de placas con A.Schaedler

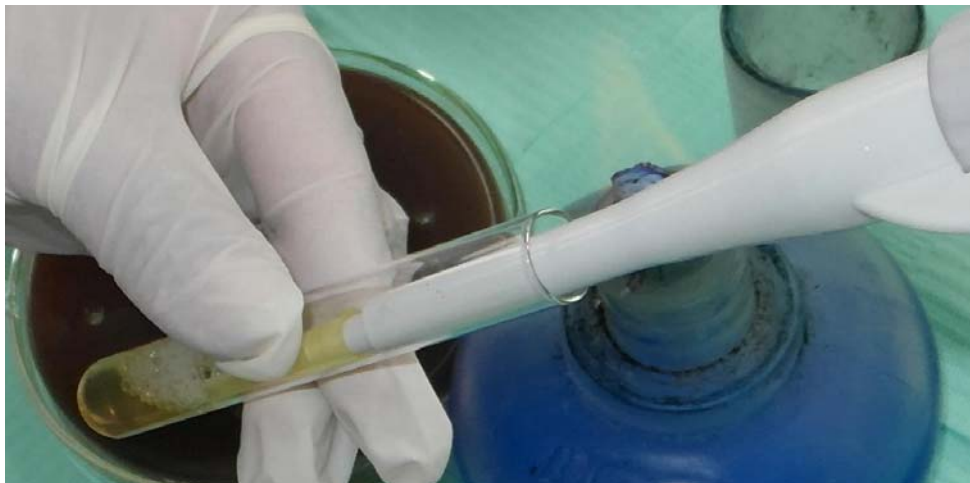
Medios preparados











Luego de inoculación en placas, colocación en tubos de anaerobiosis

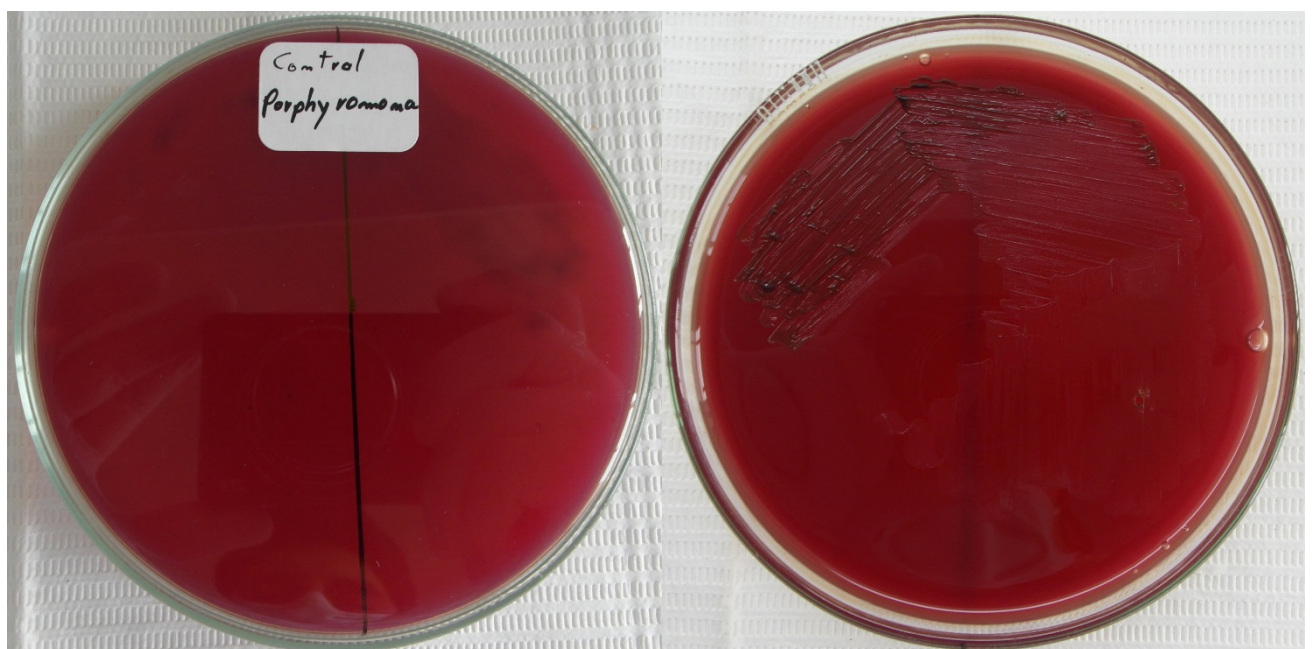
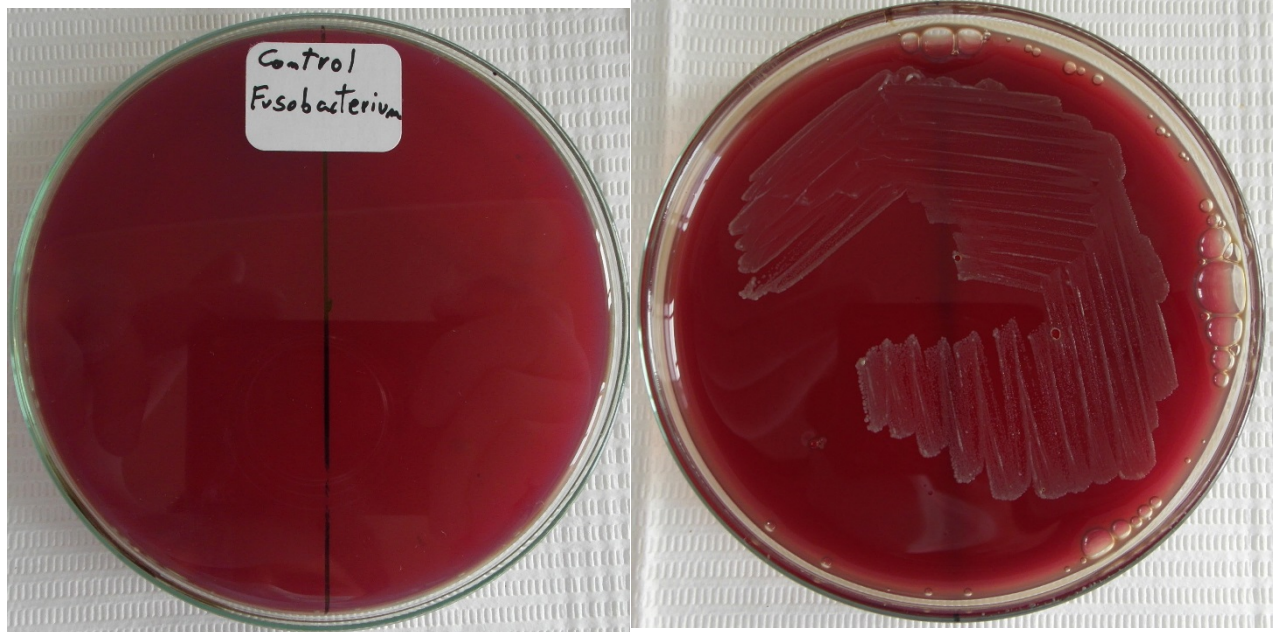




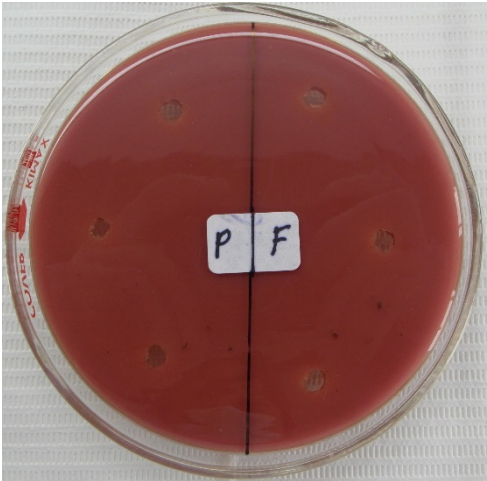
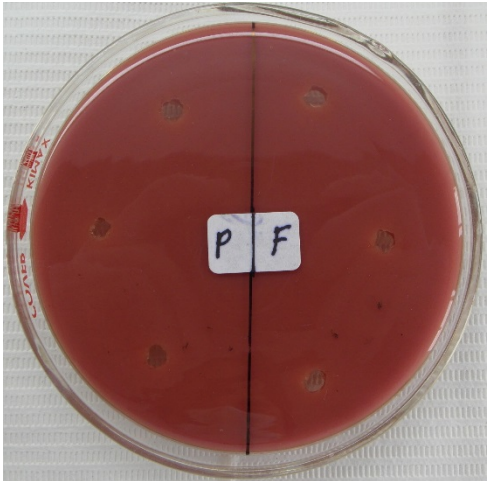
Placas en incubadora a 37° por 72 horas

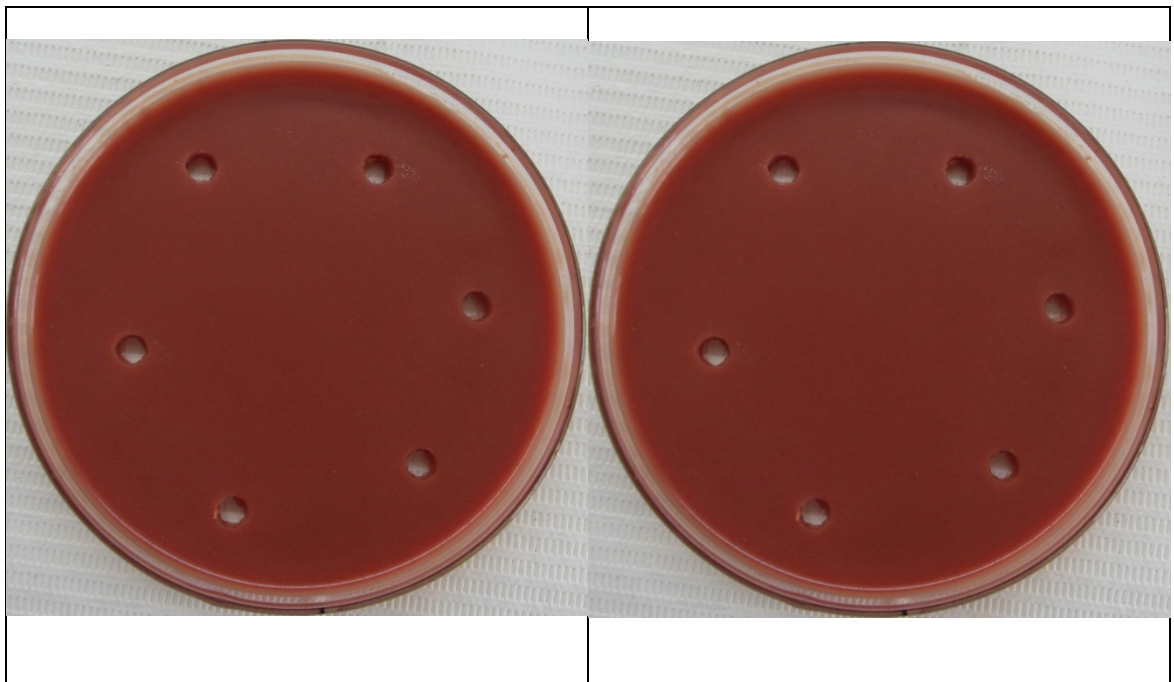



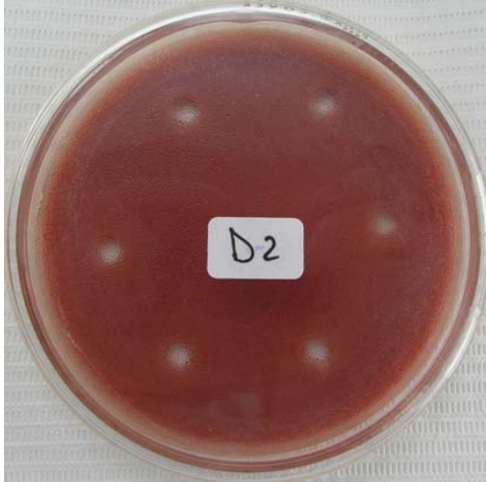
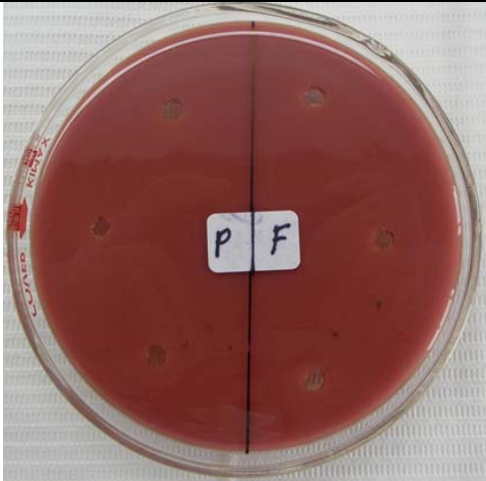
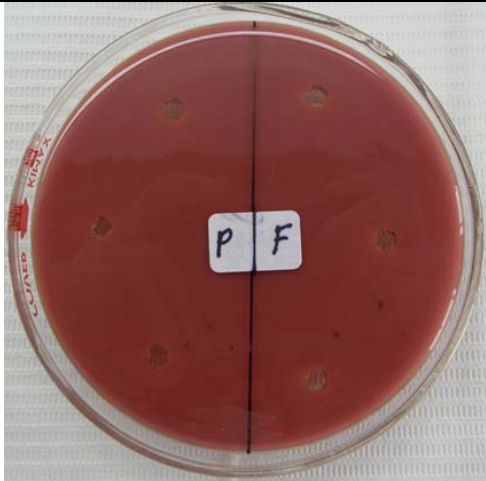
RESULTADOS

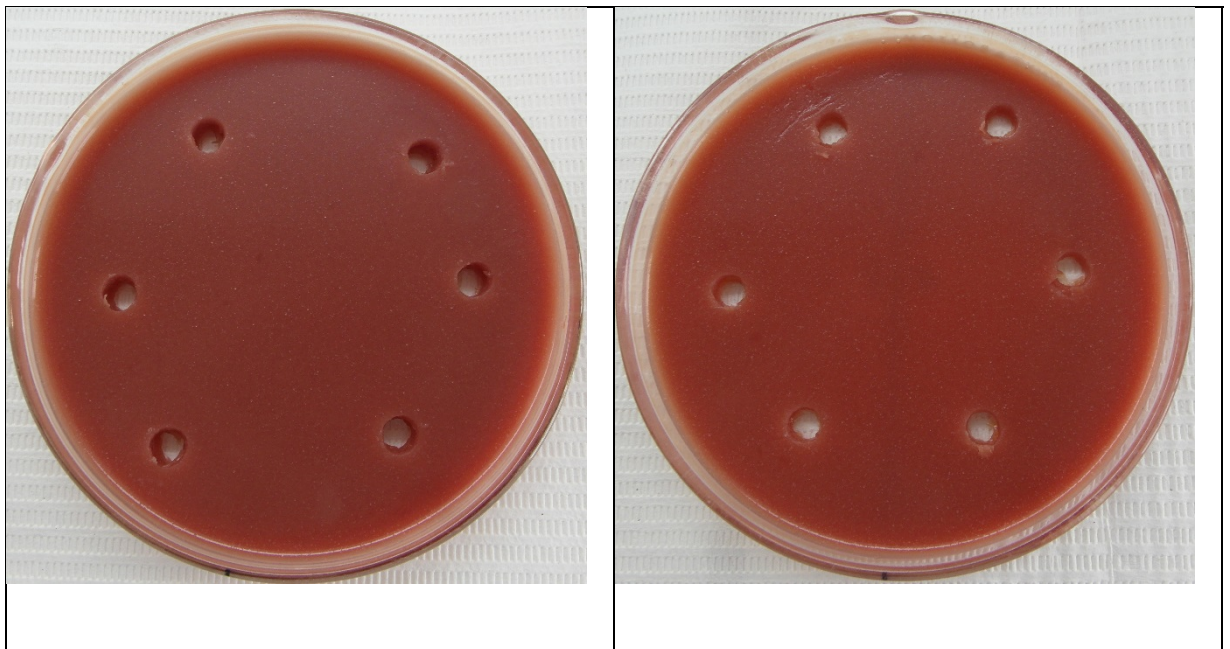
Medios de control positivo



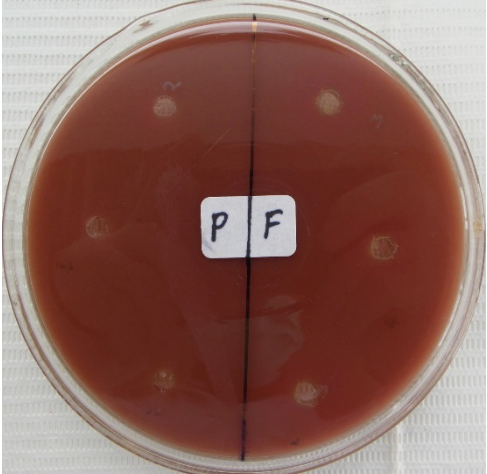
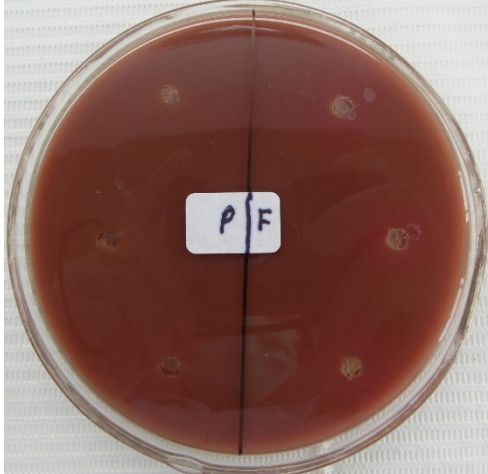


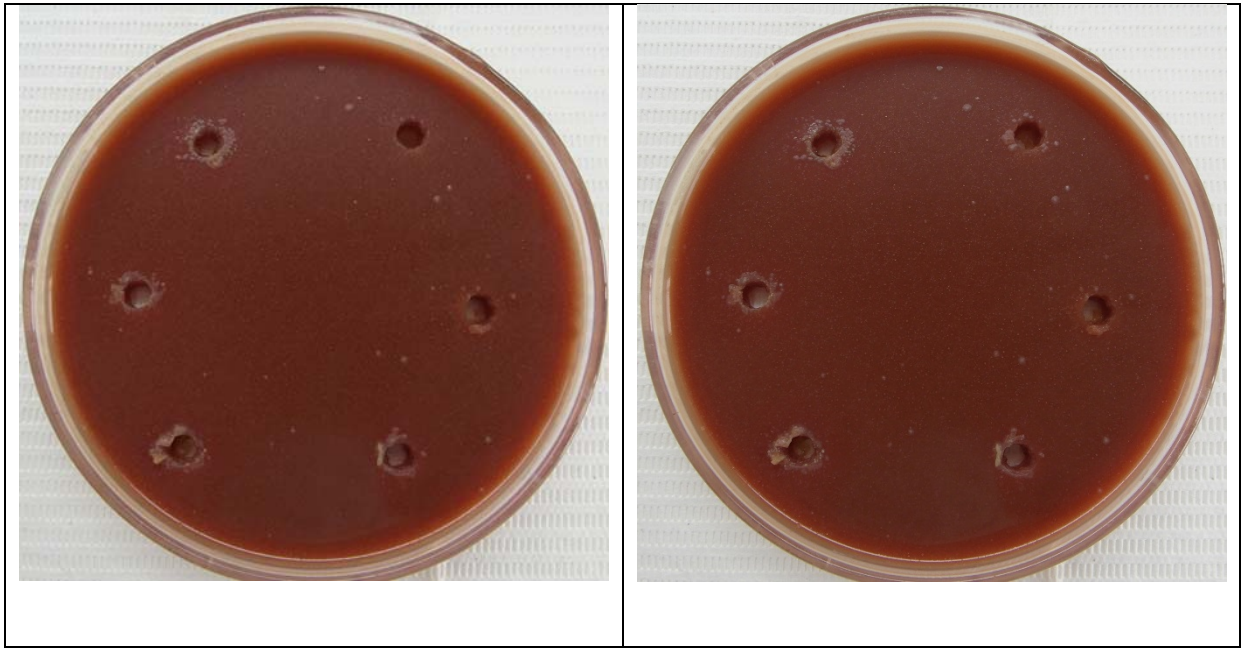
Placas de agar schaedler con óleo-resina de <i>Copaifera officinalis</i> al 100%	
Ensayo	Duplicado
	
	



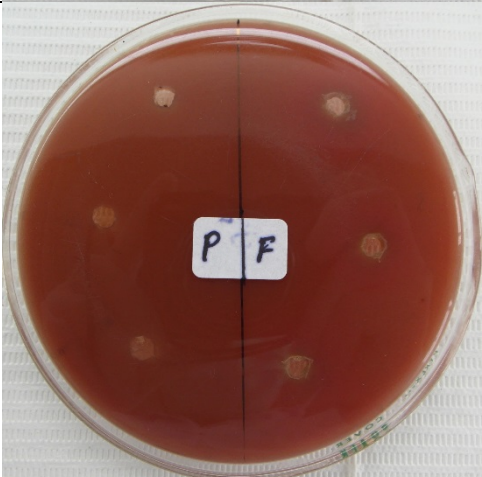
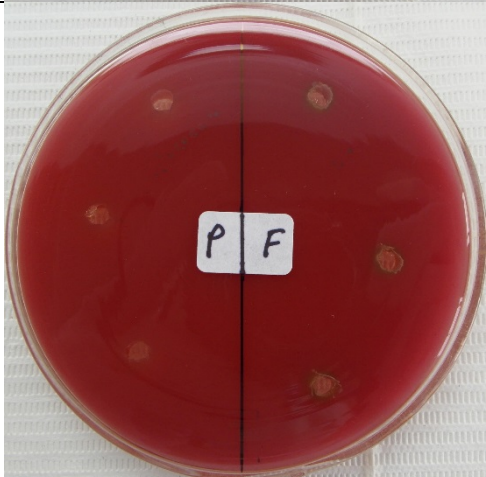


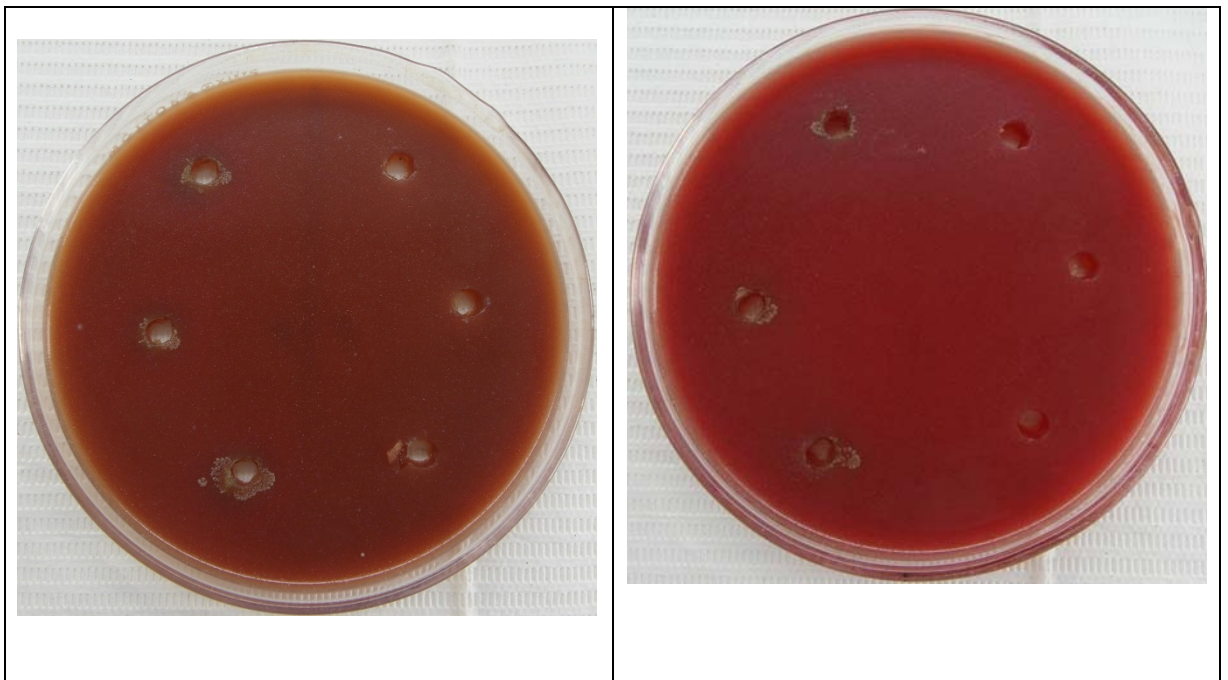
Placas de agar schaedler con óleo-resina de <i>Copaifera officinalis</i> al 50%	
Ensayo	Duplicado
	
	

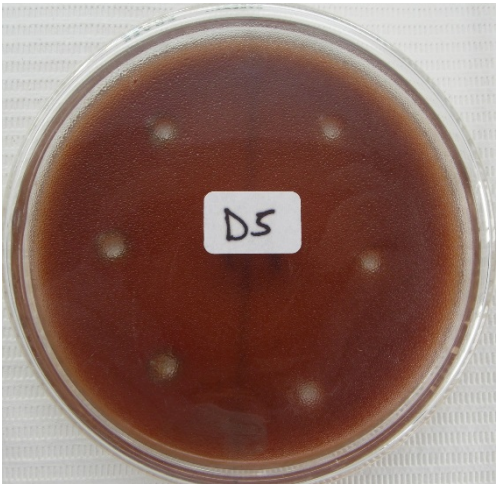

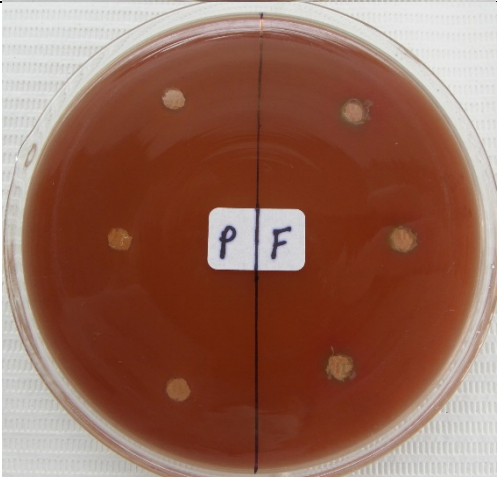
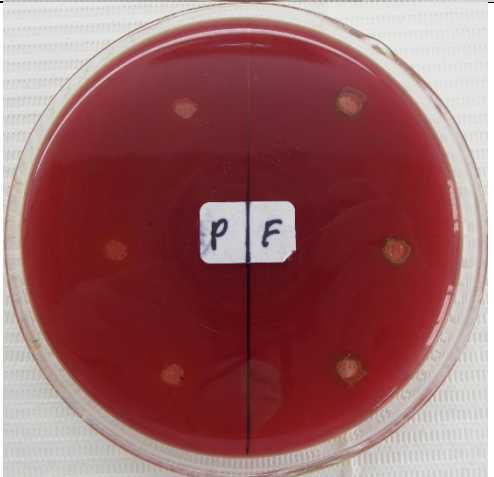


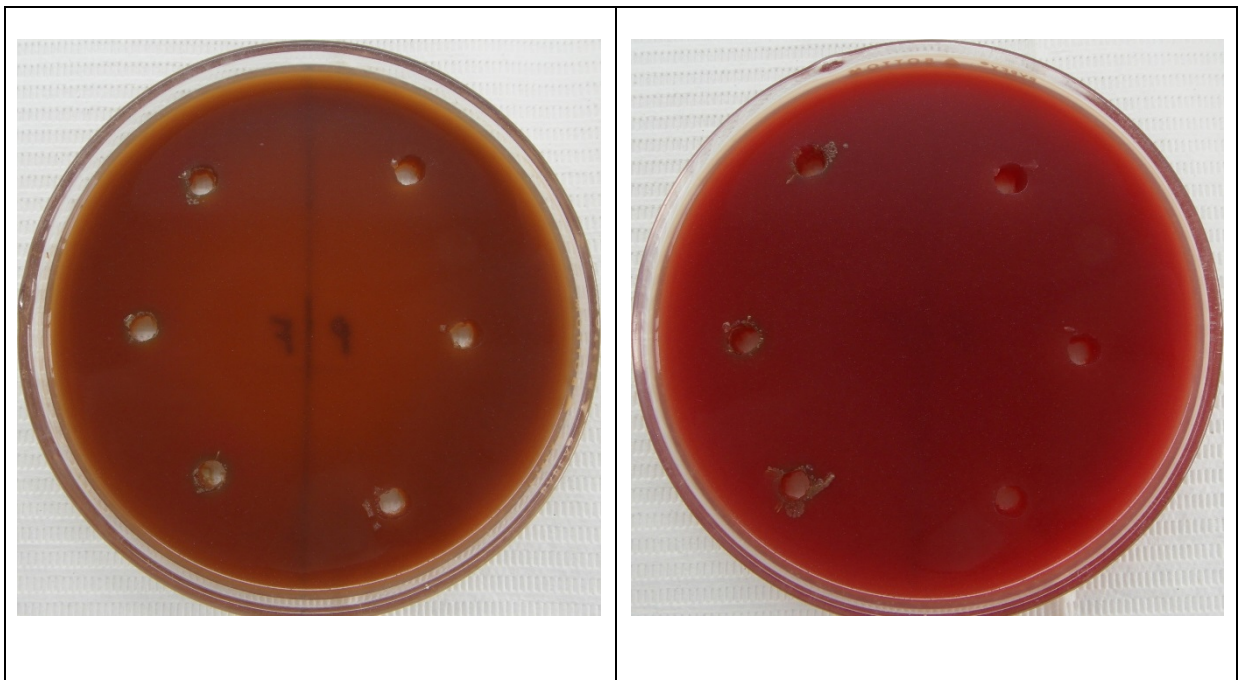
Placas de agar schaedler con óleo-resina de <i>Copaifera officinalis</i> al 25%	
Ensayo	Duplicado
	
	


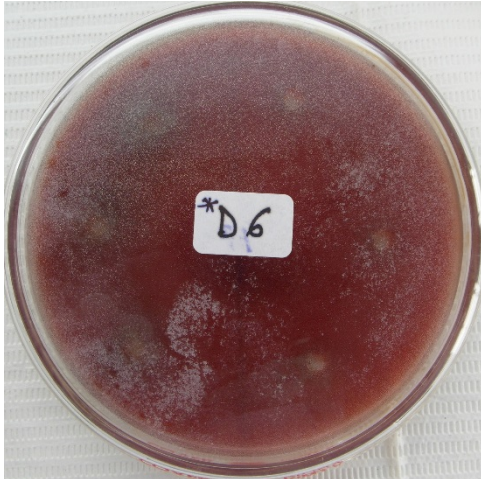
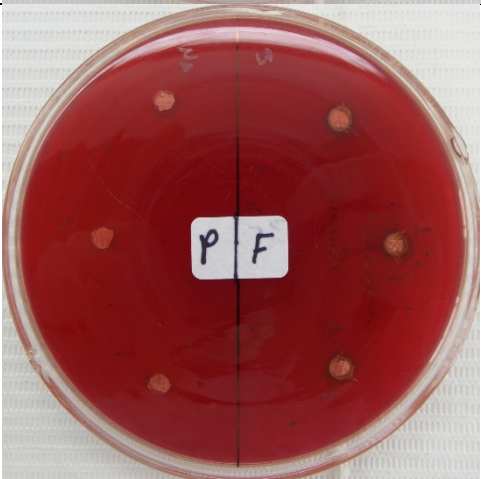
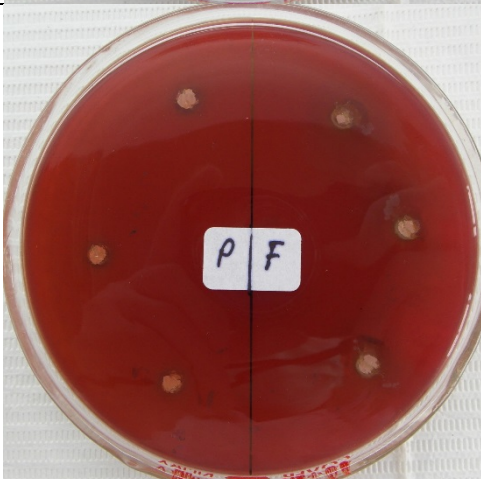


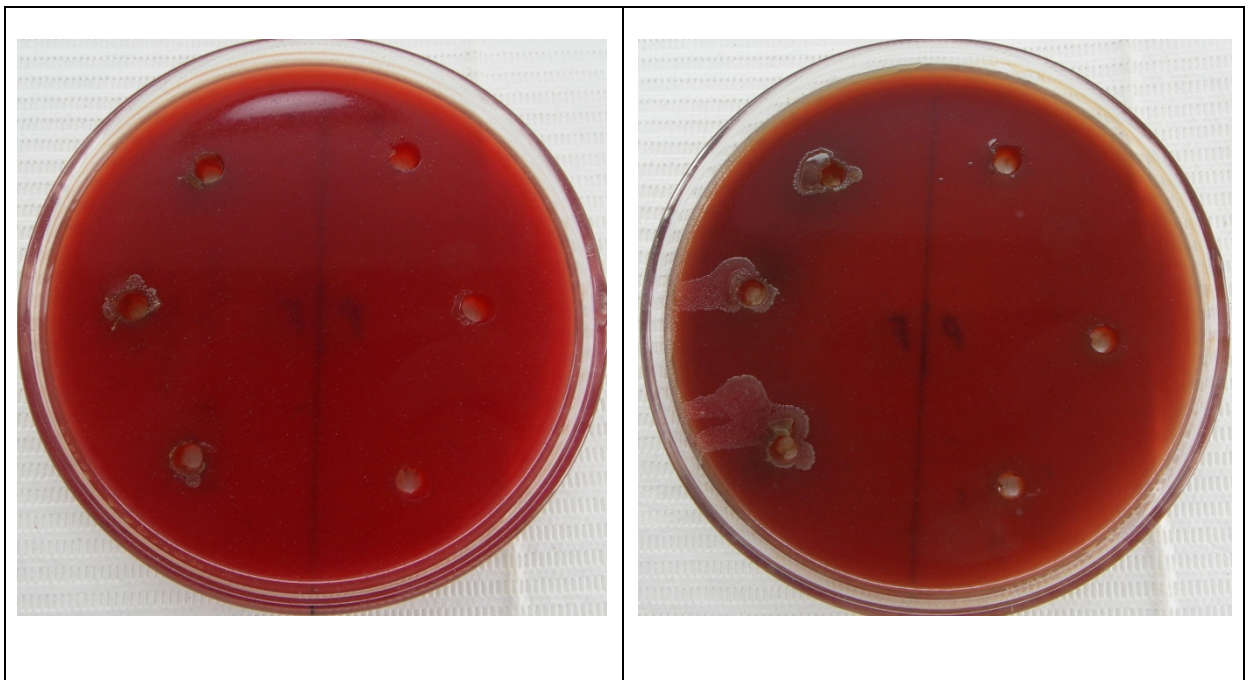
Placas de agar schaedler con óleo-resina de <i>Copaifera officinalis</i> al 12.5%	
Ensayo	Duplicado
	
	



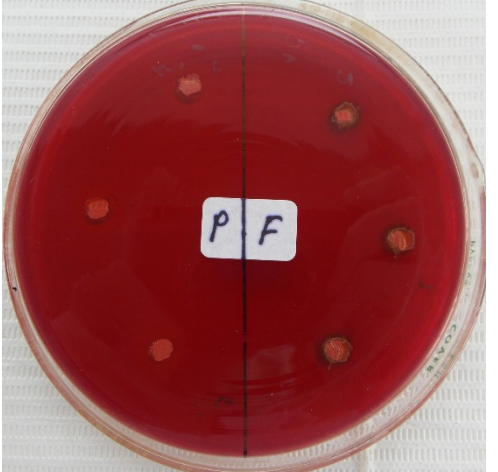
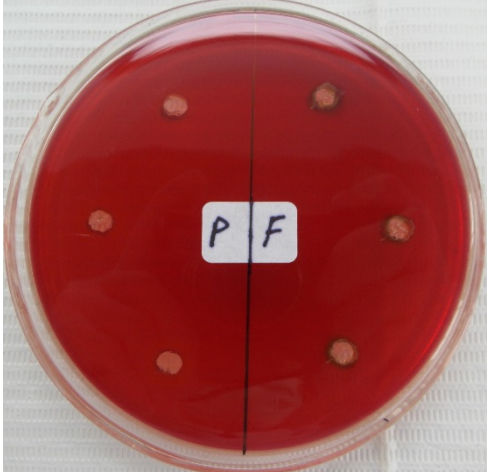


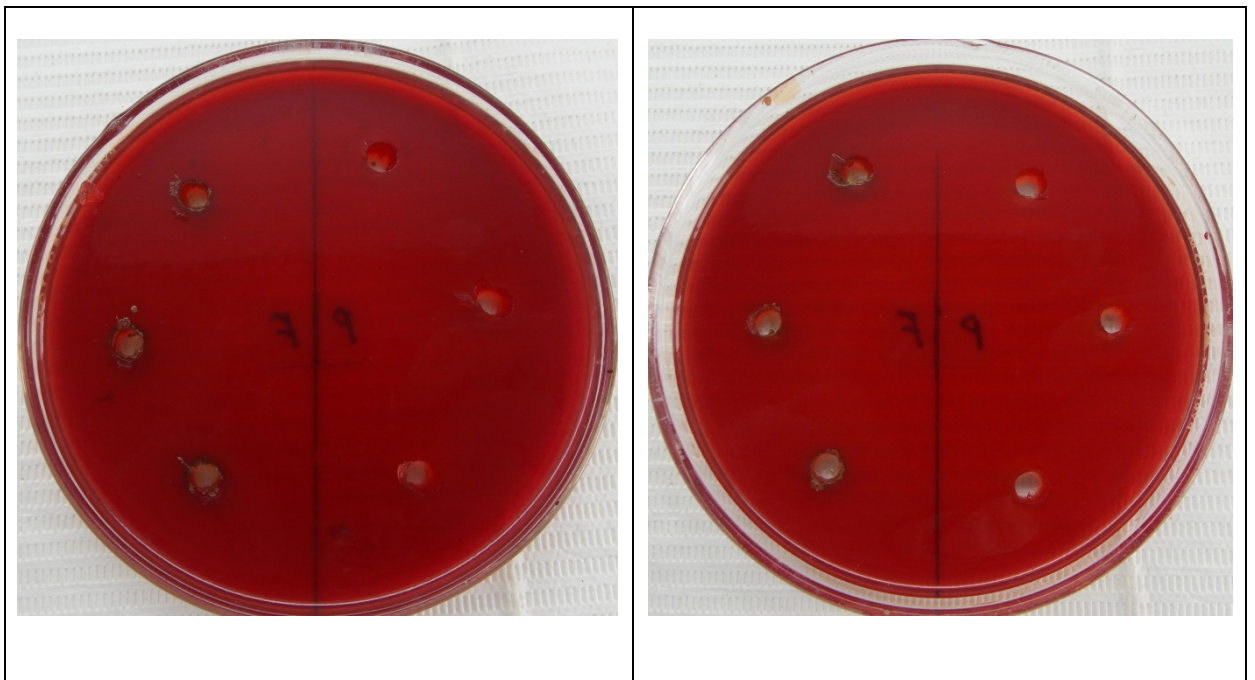
Placas de agar schaedler con óleo-resina de <i>Copaifera officinalis</i> al 6.25%	
Ensayo	Duplicado
	
	



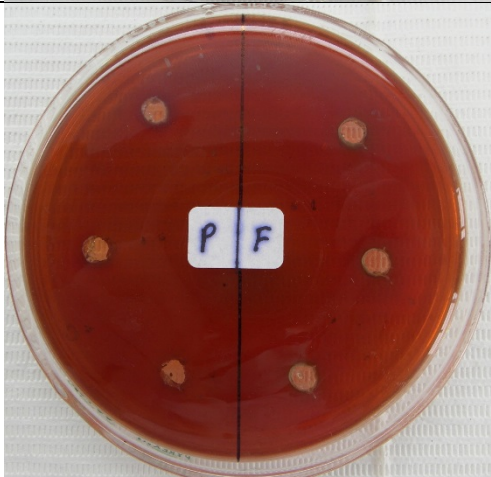
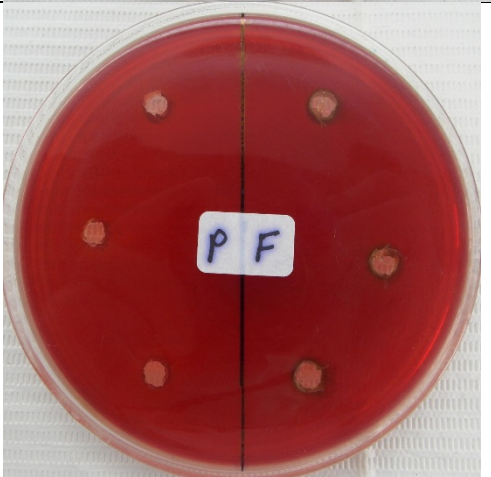


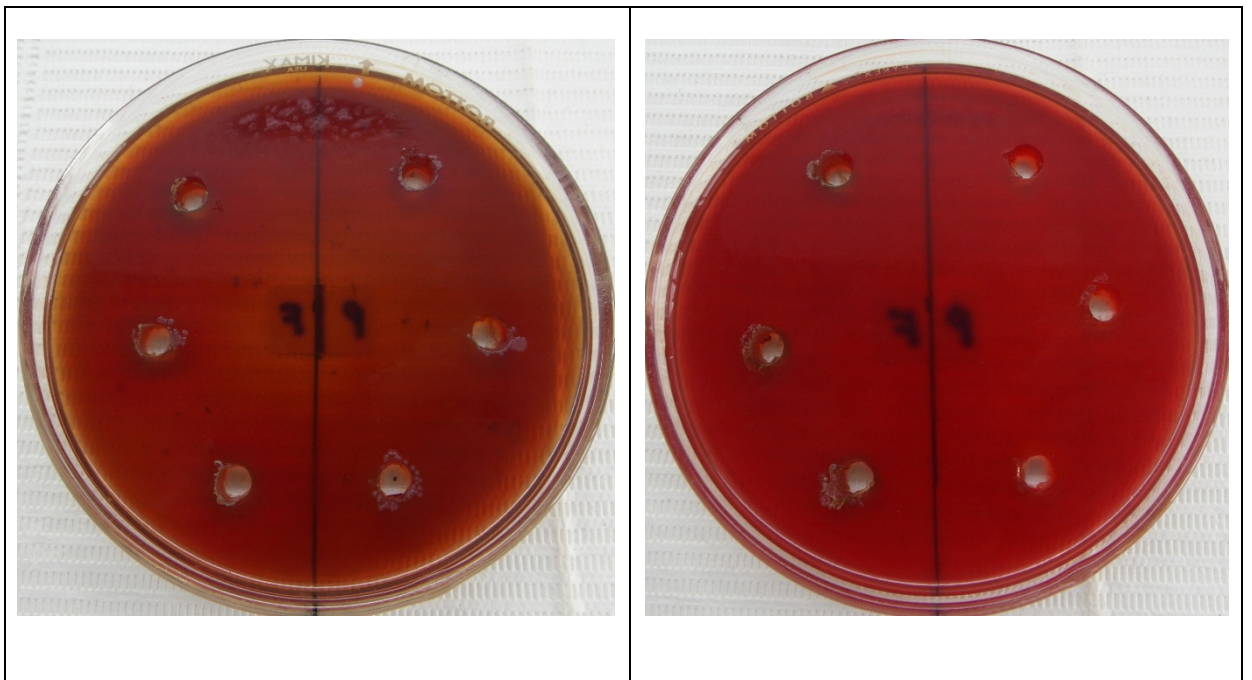
Placas de agar schaedler con óleo-resina de <i>Copaifera officinalis</i> al 3.12%	
Ensayo	Duplicado
	
	



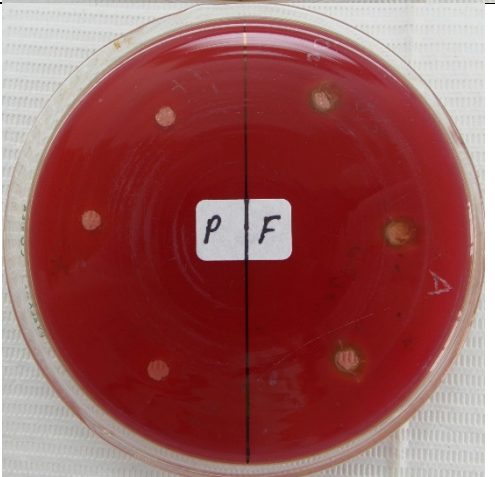
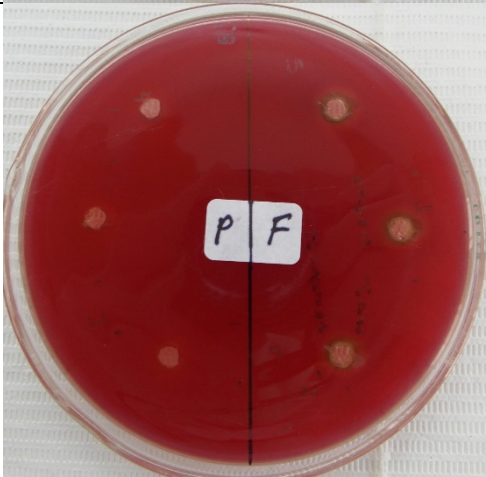


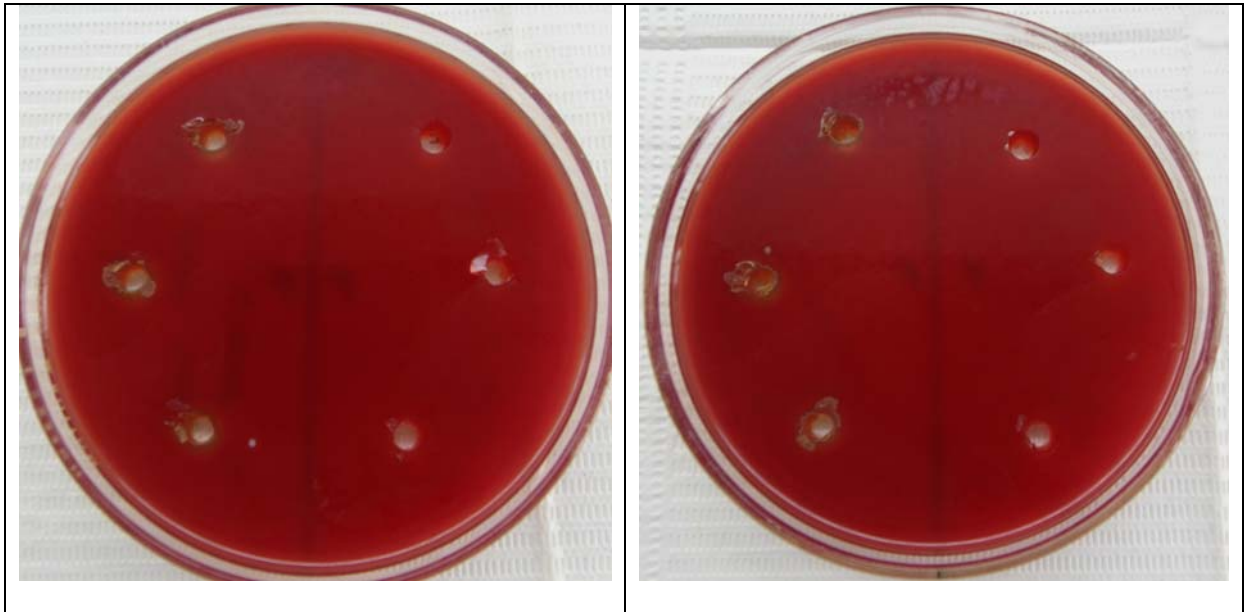
Placas de agar schaedler con óleo-resina de <i>Copaifera officinalis</i> al 1.56%	
Ensayo	Duplicado
	
	



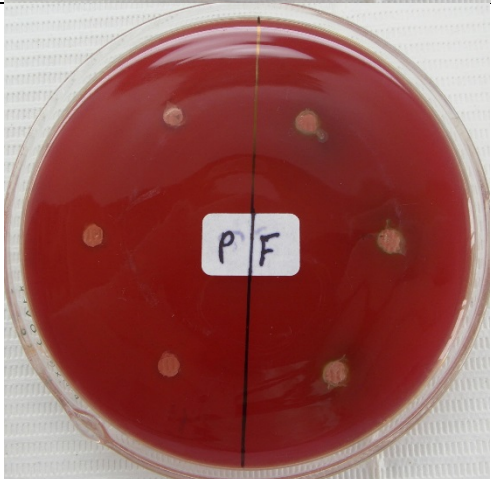
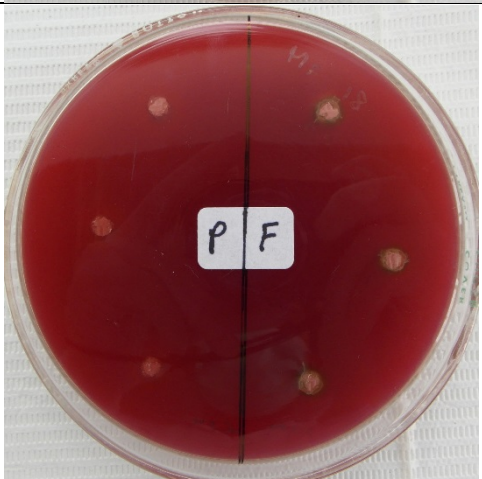


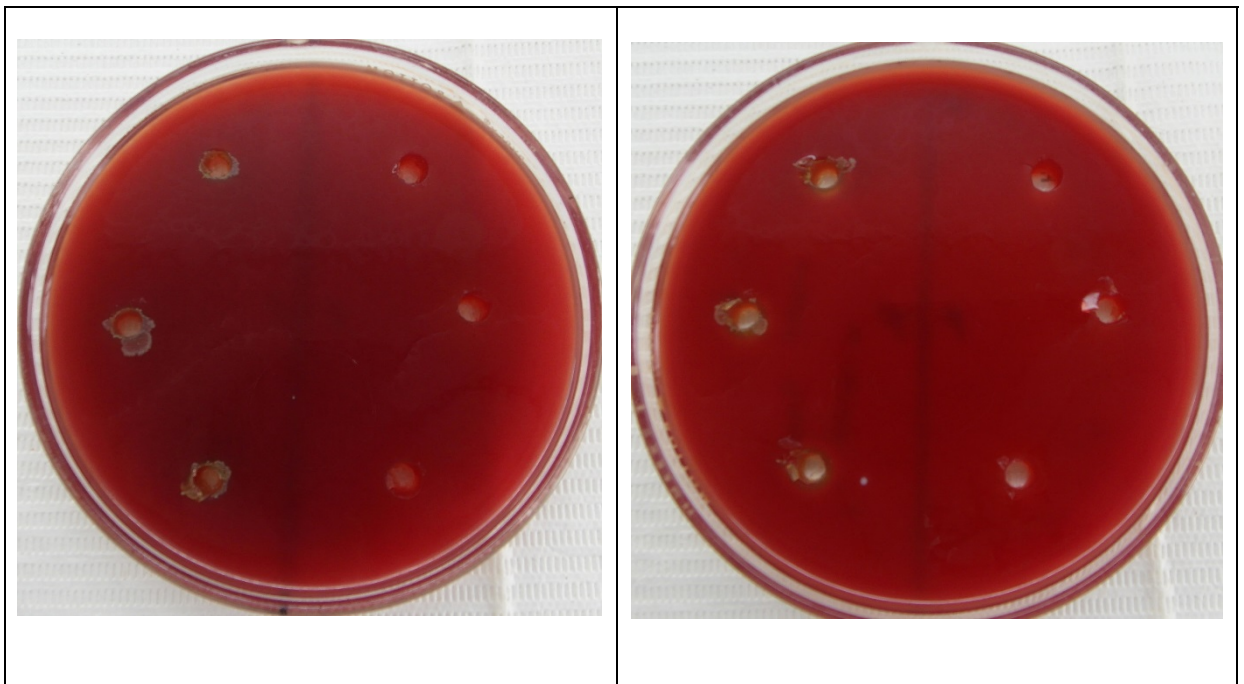
Placas de agar schaedler con óleo-resina de <i>Copaifera officinalis</i> al 0.78%	
Ensayo	Duplicado
	
	

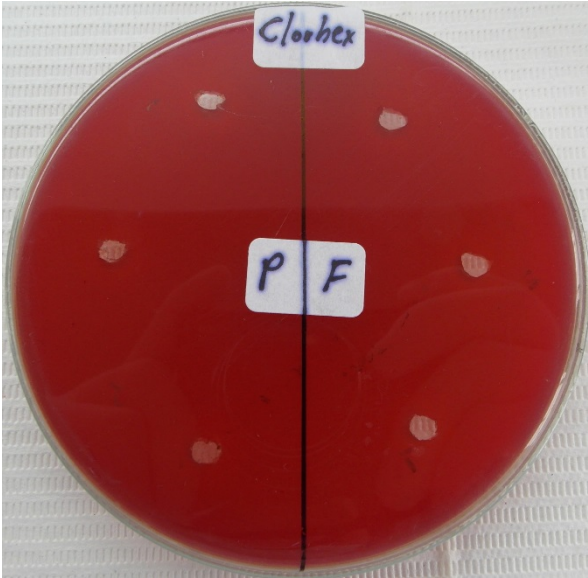
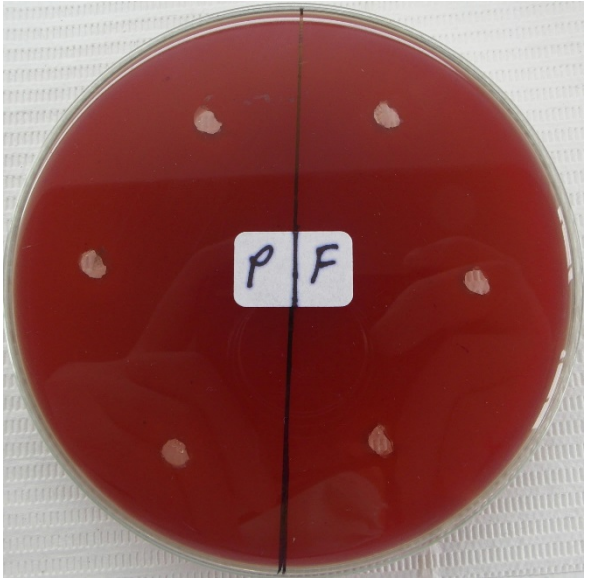
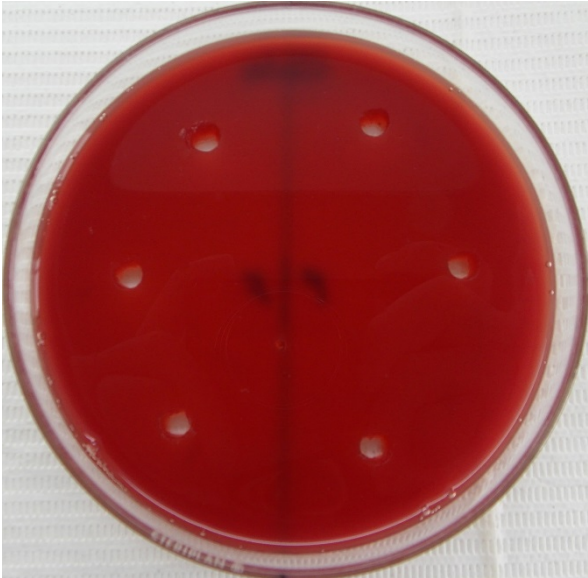
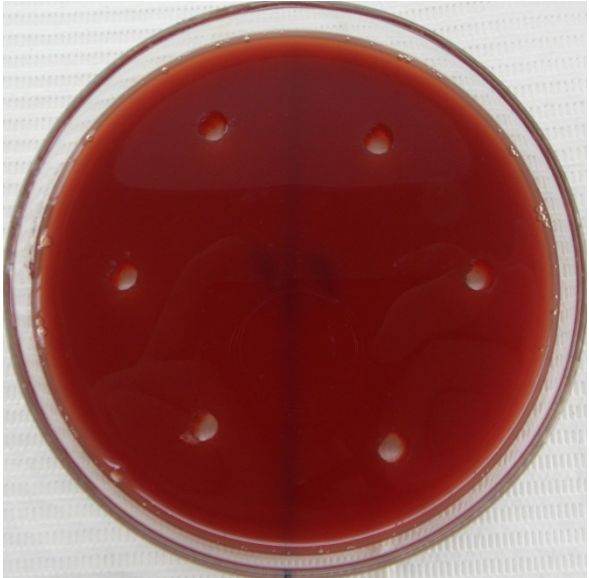


Placas de agar schaedler con óleo-resina de <i>Copaifera officinalis</i> al 0.39%	
Ensayo	Duplicado
	
	



Placas de agar schaedler con óleo-resina de <i>Copaifera officinalis</i> al 0.19%	
Ensayo	Duplicado
	
	



Placas de agar schaedler con Clorhexidina al 0.12%	
Ensayo	Duplicado
	
	

Placas de agar schaedler con agente emulsificante Tween 80 - Blanco estéril	
Ensayo	Duplicado
